

**Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A / Retinoiden im Hinblick  
auf eine Risikoabschätzung ihrer teratogenen Wirkung beim Menschen**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von Thomas Arnhold  
aus Hildesheim

1. Referent: Prof. Dr. H. Nau

2. Referent: Prof. Dr. U. Engelhardt

eingereicht am: 26.08.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.12.1999

2000

(Druckjahr)

*Meinen lieben Eltern*



## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor/Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

T. Arnhold, G. Tzimas, W. Wittfoht, and H. Nau. Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9,13-di-*cis*-retinoic acid and 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci.* **59** (1996) PL169-177.

T. Arnhold, H. Nau. Hoher Vitamin-A-Gehalt in der Leber von Schlachttieren - Risikoabschätzung von Leberverzehr während der Schwangerschaft. *Fleischwirtschaft* **78** (1998) 332-333.

### Tagungsbeiträge:

T. Arnhold, G. Tzimas, S. Plonait, W. Wittfoht, H. Nau. Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9,13-di-*cis*-retinoic acid and 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol in human plasma following liver consumption. *FASEB Summer Research Conference on Retinoids* 1996 in Copper Mountain (CO, USA).

T. Arnhold, G. Tzimas, S. Plonait, W. Wittfoht, H. Nau. Zum Metabolismus von Vitamin A beim Menschen nach Leberverzehr. *Lebensmittelchemie* **51** (1997) 43-44. *Lebensmittelchemikertag* 1996 in Freiburg.

T. Arnhold, H.J. Rothkötter, S. Meyer, A.D. Lampen, R. Pabst, H. Nau. Intestinal metabolism of excess vitamin A to retinoic acid isomers following supplementation or liver consumption. *FASEB Summer Research Conference on Retinoids* 1998 in Snowmass Village (CO, USA).

T. Arnhold, H.J. Rothkötter, S. Meyer, A.D. Lampen, R. Pabst, H. Nau. Intestinal metabolism of excess vitamin A to the receptor ligand all-*trans*-retinoic acid *in vivo*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **358** (1998) S3, R766. *Wintertagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)* 1998 in Hannover.



Die im Rahmen dieser Dissertation dargestellten Arbeiten wurden entweder am Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie (jetzt Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie) des Klinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin, oder an der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. H. Nau durchgeführt.

Die Studie zum Metabolismus von Vitamin A beim Menschen nach Leberverzehr wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Tzimas und Frau Dr. S. Plonait am Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie, Freie Universität Berlin, durchgeführt. Die im Rahmen dieses Projektes in den Plasmaproben bestimmten Blutbildparameter sowie die Bestimmung von Retinol-bindendem Protein erfolgten am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie des Klinikum Benjamin Franklin.

Die Plasmaproben zum Vergleich der Metabolitenmuster nach Supplementation und Leberverzehr wurden von Herrn Dr. A.G. Renwick, Leiter der Clinical Pharmacology Group der University of Southampton, zur Verfügung gestellt.

Der *in vivo*-Versuch am Schwein erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H.J. Rothkötter und Herrn Prof. Dr. R. Pabst vom Zentrum für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit Unterstützung von Frau S. Meyer, Frau S. Sczesny und Herrn Dr. Dr. A. Lampen.

Die Untersuchungen zur Teratogenität von Retinoiden bei gleichzeitiger Gabe von Phytansäure bzw. Phytol fanden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M.M.A. Elmazar, Gastprofessor der King Saud University (Riyadh, Saudi-Arabien), statt.

Die Analytik von Retinoiden mittels HPLC gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion wurde zusammen mit Herrn Dr. G. Hamscher durchgeführt. Die Synthese der Retinylester fand in Zusammenarbeit mit Frau Dr. U. Ellerbeck statt. Die Messung von Proben erfolgte teilweise mit Unterstützung von Frau C. Plum und Frau B. Priess. Die Identifizierung von Retinsäure-Isomeren mittels GC-MS wurde in Zusammenarbeit mit Herrn W. Wittfoht durchgeführt.





# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	HISTORISCHER ÜBERBLICK .....	1
1.2	NOMENKLATUR UND STRUKTUR VON RETINOIDEN .....	2
1.2.1	Der Begriff „Retinoide“ .....	2
1.2.2	Der Begriff „Vitamin A“ .....	2
1.2.3	Struktur natürlicher und synthetischer Retinoide .....	3
1.3	RETINOID-BINDENDE PROTEINE UND NUKLEÄRE REZEPTOREN.....	4
1.3.1	Retinol-bindendes Protein (retinol-binding protein, RBP).....	4
1.3.2	Zelluläre Bindeproteine .....	5
1.3.3	Nukleäre Retinoid-Rezeptoren .....	5
1.4	AUFNAHME, TRANSPORT UND METABOLISMUS VON VITAMIN A .....	6
1.4.1	Vitamin-A-Quellen .....	6
1.4.2	Absorption und Metabolismus im Intestinaltrakt.....	7
1.4.3	Transport in die Leber, hepatischer Metabolismus und Speicherung.....	12
1.4.4	Mobilisierung aus der Leber und Aufnahme in extrahepatische Zellen .....	12
1.4.5	Intrazellulärer Metabolismus von Vitamin A.....	13
1.4.5.1	Biosynthese von Retinsäuren .....	14
1.4.5.2	Phase-I-Metabolismus von Retinsäuren .....	18
1.4.5.3	Phase-II-Metabolismus von Retinsäuren.....	19
1.4.5.4	Metabolismus von Retinol zu <i>retro</i> -Retinoiden .....	20
1.4.5.5	Bildung anderer Metabolite aus Retinol.....	21
1.5	WIRKUNGSMECHANISMEN VON RETINOIDEN.....	22
1.5.1	Genregulation durch Retinoide und Retinoid-Rezeptoren.....	22
1.5.2	Andere Mechanismen.....	23
1.6	PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON RETINOIDEN .....	24
1.6.1	Wachstum.....	25
1.6.2	Proliferation und Differenzierung von Epithelgeweben .....	25
1.6.3	Reproduktion.....	25
1.6.4	Sehprozeß.....	26
1.6.5	Immunfunktion .....	26
1.7	RETINOIDE ALS THERAPEUTIKA IN DER DERMATOLOGIE UND KREBSTHERAPIE.....	27
1.7.1	Dermatologie .....	27
1.7.2	Krebsprävention und -therapie .....	27
1.8	TOXIZITÄT VON RETINOIDEN.....	28
1.9	RETINOIDE IN DER EMBRYONALENTWICKLUNG .....	29
1.9.1	Molekulare Mechanismen.....	29
1.9.2	Vitamin-A-Defizienz.....	32

# Inhaltsverzeichnis

---

1.9.3	Vitamin-A-Überschuß .....	32
1.9.4	Bedeutung von Metabolismus und Pharmakokinetik .....	33
1.10	LEBERVERZEHR IN DER SCHWANGERSCHAFT.....	34
1.11	PHYTOL ALS VORLÄUFERSUBSTANZ VON PHYTANSÄURE .....	37
1.12	ANALYTIK VON RETINOIDEN .....	40
<b>2</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>45</b>
3.1	CHEMIKALIEN.....	45
3.1.1	Retinoide .....	45
3.1.2	Chemikalien und Chromatographie-Material.....	47
3.1.3	Sonstiges.....	48
3.2	PROBANDEN FÜR HUMANSTUDIEN UND VERSUCHSTIERE.....	49
3.2.1	Menschliche Probanden.....	49
3.2.1.1	Studie zum Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr.....	49
3.2.1.2	Studie zum Vergleich Supplement - Leberverzehr .....	49
3.2.2	Versuchstiere.....	49
3.2.2.1	Schwein .....	49
3.2.2.2	Mäuse .....	50
3.3	HUMANSTUDIEN .....	50
3.3.1	Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr.....	50
3.3.2	Vergleich Supplement - Leberverzehr .....	51
3.4	INTESTINALER METABOLISMUS UND TRANSPORT VON VITAMIN A.....	52
3.4.1	In vitro-Metabolismus .....	52
3.4.1.1	Gewinnung subzellulärer Fraktionen.....	52
3.4.1.2	Proteinbestimmung .....	52
3.4.1.3	Versuchsdurchführung.....	53
3.4.2	In vivo-Metabolismus von Vitamin A im Schwein.....	54
3.4.2.1	Operation .....	55
3.4.2.2	Versuchsdurchführung.....	55
3.5	EINFLUß VON PHYTOL/PHYTANSÄURE AUF TERATOGENITÄT UND METABOLISMUS VON ALL-TRANS-RA BZW. RETINOL IN MÄUSEN.....	56
3.5.1	Teratogenitäts-Untersuchungen.....	56
3.5.2	Plasmakinetik von Retinoiden in nicht-trächtigen Mäusen.....	57
3.5.3	Retinoid-Konzentrationen in embryonalem Gewebe und maternalem Plasma.....	58
3.6	SYNTHESE VON RETINYLESTERN .....	58
3.7	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC).....	59
3.7.1	Verwendete Geräte.....	59

# Inhaltsverzeichnis

---

3.7.2	HPLC gekoppelt mit off-line Festphasenextraktion und on-line Elution.....	60
3.7.3	HPLC-Kopplung mit Diodenarray-Detektion (DAD) und Massenspektrometrie (MS) .....	62
3.7.4	Probenaufbereitung für die Retinoid-Analytik.....	63
3.7.4.1	Verwendete Geräte .....	63
3.7.4.2	Feste Proben (Gewebe) .....	64
3.7.4.3	Probenaufbereitung A .....	64
3.7.4.4	Probenaufbereitung B.....	65
3.7.4.5	Probenaufbereitung C.....	65
3.7.4.6	Probenaufbereitung D .....	65
3.7.4.7	Probenaufbereitung E.....	66
3.7.5	Verfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Retinoid-Analytik .....	67
3.7.5.1	HPLC-Methode I.....	68
3.7.5.2	HPLC-Methode II .....	69
3.7.5.3	HPLC-Methode III .....	70
3.7.5.4	HPLC-Methode IV .....	71
3.7.5.5	HPLC-Methode V .....	72
3.7.5.6	HPLC-Methode VI.....	73
3.8	METHODEN ZUR WEITEREN IDENTIFIZIERUNG VON RETINOID-METABOLITEN .....	74
3.8.1	Enzymatische Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase zur Identifizierung von Retinoid-Glukuroniden.....	74
3.8.2	GC/MS von Retinsäuren nach Methylierung .....	75
3.8.3	Aufnahme von UV-Spektren im HPLC-System .....	76
3.9	BESTIMMUNG VON RETINOL-BINDENDEM PROTEIN (RBP).....	77
3.10	BERECHNUNG PHARMAKOKINETISCHER PARAMETER .....	77
3.11	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	78
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>79</b>
4.1	METABOLISMUS VON VITAMIN A NACH DEM VERZEHR EINER LEBERMAHLZEIT .....	79
4.1.1	Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes der Lebermahlzeit.....	79
4.1.2	Identifizierung neuer Vitamin-A-Metaboliten in Humanplasma.....	81
4.1.3	Endogene Retinoid-Konzentrationen in Humanplasma.....	84
4.1.4	Plasmakinetik von Retinol und Retinylestern.....	84
4.1.5	Plasmakinetik polarer Retinoid-Metaboliten .....	85
4.1.6	Retinol-bindendes Protein (RBP) und molares Verhältnis Retinol/RBP .....	88
4.1.7	Zusammenfassung .....	89
4.2	VERGLEICH DER METABOLITENMUSTER NACH SUPPLEMENTATION BZW. LEBERMAHLZEIT .....	89
4.3	INTESTINALER METABOLISMUS VON VITAMIN A.....	93
4.3.1	In vitro-Metabolismus durch cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms.....	93
4.3.2	Intestinaler Metabolismus von Vitamin A im Schwein nach Gabe von Leber oder Supplement.....	95
4.3.2.1	Endogener Retinoid-Status im Schwein .....	96

# Inhaltsverzeichnis

---

4.3.2.2	Kinetik von Retinol und Retinylpalmitat/-oleat .....	97
4.3.2.3	Kinetik der Retinsäuren .....	100
4.3.2.4	Kinetik der Phase-I- und Phase-II-Metaboliten .....	102
4.3.2.5	Kinetik sonstiger Retinoid-Metabolite .....	104
4.3.2.6	Zusammenfassung .....	106
4.4	EINFLUß VON PHYTOL/PHYTANSÄURE AUF TERATOGENITÄT, METABOLISMUS UND KINETIK VON ALL-TRANS-RA BZW. RETINOL .....	107
4.4.1	Teratogenität nach Einzelgaben von POH bzw. PA an trächtige Mäuse .....	108
4.4.2	Endogene Retinoide .....	108
4.4.2.1	Nichtträchtige Mäuse .....	108
4.4.2.2	Trächtige Mäuse und Embryogewebe (GD 11) .....	109
4.4.3	Gabe von RA allein oder mit PA bzw. POH .....	109
4.4.3.1	Teratogenitäts-Untersuchungen .....	109
4.4.3.2	Plasmakinetik in nichtträchtigen Mäusen .....	110
4.4.3.3	Maternale und embryonale Exposition .....	113
4.4.4	Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA .....	115
4.4.4.1	Teratogenitäts-Untersuchungen .....	115
4.4.4.2	Plasmakinetik in nichtträchtigen Mäusen .....	116
4.4.4.3	Maternale und embryonale Exposition .....	120
4.4.5	Zusammenfassung .....	123
4.5	VERGLEICH VON HPLC-UV- MIT HPLC-DAD-MS <sup>N</sup> -DETEKTION .....	125
4.6	IDENTIFIZIERUNG VON ALL-TRANS-4-HYDROXY-RA ALS EMBRYONALEN METABOLITEN .....	126
4.7	ANALYSE EINER PLASMA- UND EINER GEWEBEPROBE MITTELS LC-MS-MS .....	135
5	DISKUSSION .....	137
5.1	METABOLISMUS VON VITAMIN A NACH LEBERVERZEHRE .....	137
5.1.1	Vitamin-A-Gehalt der Leber .....	137
5.1.2	Bedeutung der neu identifizierten Plasma-Metaboliten .....	138
5.1.2.1	9-cis-RA .....	138
5.1.2.2	9,13-di-cis-RA .....	141
5.1.2.3	14-HRR .....	142
5.1.3	Bedeutung anderer Plasma-Metaboliten von Vitamin A .....	143
5.1.3.1	Retinol und RBP .....	143
5.1.3.2	Retinylester .....	146
5.1.3.3	All-trans-RA .....	147
5.1.3.4	13-cis-RA .....	148
5.1.3.5	13-cis-4-oxo-RA .....	149
5.1.4	Metabolitenmuster in Humanplasma nach Supplementation bzw. Leberverzehr .....	151
5.2	DIE ROLLE DES INTESTINALTRAKTES NACH GABE HOHER VITAMIN-A-DOSEN .....	152
5.2.1	In vitro-Oxidation von Retinol zu all-trans-RA .....	152

# Inhaltsverzeichnis

---

5.2.2	<i>Intestinaler Metabolismus von Vitamin A in vivo</i> .....	155
5.2.3	<i>Schlußfolgerungen</i> .....	158
5.3	ABSCHÄTZUNG EINES TERATOGENEN RISIKOS DURCH LEBERVERZEHR .....	160
5.3.1	<i>Extrapolation tierexperimenteller Untersuchungen zur Teratogenität und Pharmakokinetik von Retinoiden</i> .....	161
5.3.2	<i>Vergleich mit epidemiologischen und experimentellen Humanstudien</i> .....	163
5.3.3	<i>Schlußfolgerungen</i> .....	166
5.4	PHYTANSÄURE/PHYTOL ALS SYNERGISTEN RETINOID-INDUZierter TERATOGENITÄT .....	167
5.4.1	<i>Teratogenitäts-Untersuchungen</i> .....	167
5.4.2	<i>Kinetik, Metabolismus und embryonale Exposition</i> .....	169
5.4.3	<i>Schlußfolgerungen</i> .....	174
5.5	HPLC GEKOPPELT MIT DIODENARRAY- UND MS-MS-DETEKTION IN DER RETINOID-ANALYTIK .....	176
6	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	179
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	185
8	<b>ANHANG</b> .....	225
8.1	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....	225
8.2	TABELLEN UND ABBILDUNGEN .....	226



### **1 Einleitung**

#### **1.1 Historischer Überblick**

Schon im alten Ägypten war Nachtblindheit eine wohlbekannte Krankheit. Heilung von dieser Krankheit versprach die topische Anwendung von Saft aus gebratener Leber. Die Griechen der Antike, die mit der medizinischen Praxis der Ägypter vertraut waren, empfahlen zur Behandlung dieser Krankheit die topische Anwendung oder den Verzehr von gebratener Leber (Wolf 1978). Diese traditionelle Anwendung von Öl oder Saft gebratener Leber hat in einigen Gemeinschaften noch bis heute Gültigkeit, wobei Vitamin A das aktive Agens dieser Anwendung darstellt. Zu Beginn dieses Jahrhunderts entdeckte der Engländer Frederick Gowland Hopkins eine wachstumsstimulierende Wirkung in alkoholischen Extrakten der Milch. Kurze Zeit später identifizierte der Deutsche Stepp einen der sogenannten „minimalen qualitativen Faktoren“ als Lipidbestandteil. 1913 fanden McCollum und Davis einen essentiellen Faktor für das Wachstum von Ratten, der in Butter und Eigelb, aber nicht in Schmalz vorkam (McCollum and Davis 1913). Sie nannten diesen Faktor „*fat-soluble A*“. Gleichzeitig entdeckten Osborne und Mendel einen ähnlichen fettlöslichen Wachstumsfaktor in Lebertran und Butter (Osborne and Mendel 1913). Das Jahr 1913 markierte somit den Beginn der ernährungswissenschaftlichen Geschichte von Vitamin A. Es zeigte sich, daß auch pigmentiertes Gemüse Substanzen enthielt, die eine wachstumsfördernde Wirkung aufwiesen. Kurze Zeit später konnte schließlich bewiesen werden, daß das farbige  $\beta$ -Carotin aus Pflanzen biologisch zum farblosen Vitamin A umgewandelt wird, das dann in der Leber gespeichert wird (Moore 1930). Die Strukturen von Vitamin A und  $\beta$ -Carotin wurden zur gleichen Zeit aufgeklärt (Karrer et al. 1930a; Karrer et al. 1931b). In den 50er Jahren gelangen die chemischen Synthesen von Retinsäure (Arens and van Dorp 1946), Retinol (Isler et al. 1947) und  $\beta$ -Carotin (Karrer and Eugster 1950). Die physiologische Bedeutung von Vitamin A wurde ebenfalls zu dieser Zeit untersucht. In den 40er Jahren identifizierte Wald das Chromophor der Sehpigmente als Retinal und begründete damit die Beteiligung von Vitamin A am Sehprozeß (Wald 1934). Weitere Entdeckungen zeigten die fundamentale Bedeutung von Vitamin A in der Embryonalentwicklung (Hale 1933; Wilson et al. 1953), in der Regulierung der Differenzierung von epithelialen Geweben (Wolbach and Howe 1925), in der Erhaltung des Immunsystems (Lassen 1930) und in der Reproduktion (Thompson et al. 1964).

## **1.2 Nomenklatur und Struktur von Retinoiden**

### **1.2.1 Der Begriff „Retinoide“**

Gemäß der IUPAC-IUB-Kommission<sup>1</sup> für Biochemische Nomenklatur (1982) ist der Begriff Retinoide wie folgt definiert (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) 1982):

*„Retinoide gehören zu einer Klasse von Komponenten, die aus vier Isopreneinheiten bestehen, die in einer Kopf-Schwanz-Verbindung stehen; alle Retinoide können formell von einer monozyklischen Elternkomponente abgeleitet werden, die fünf C-C-Doppelbindungen und eine funktionelle Gruppe am azyklischen Ende des Moleküls enthalten.“*

Da in den 80er Jahren synthetische Komponenten gefunden wurden, die nicht diese Strukturanforderungen erfüllten, aber trotzdem in verschiedenen Retinoid-sensitiven, biologischen Assays wesentlich aktiver waren als Retinol (Newton et al. 1980), wurde die oben angegebene Definition als nicht ausreichend angesehen. Als ergänzende oder ersetzende Definition wurde vorgeschlagen, daß *„Retinoide eine Klasse von Substanzen sind, die spezifische biologische Antworten durch Bindung an und Aktivierung von Rezeptoren hervorrufen“* (Sporn and Roberts 1985).

Auch diese Definition muß überdacht werden, da inzwischen einige Retinoide existieren, die ihre biologische Aktivität nachweislich nicht über die Beteiligung von Rezeptoren entfalten (Sani et al. 1995; Ross and Hämmerling 1994).

In einer nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft gültigen Definition sollte daher **entweder** die Strukturverwandschaft zu Vitamin A **oder** eine mit Vitamin A vergleichbare biologische Aktivität Voraussetzung für die Zugehörigkeit zur Klasse der Retinoide sein.

### **1.2.2 Der Begriff „Vitamin A“**

Vitamin A ist ein allgemeiner Begriff, der jedes Retinoid umschreibt, das eine biologische Aktivität aufweist, die qualitativ der von Retinol entspricht (Sporn and Roberts 1985; Blomhoff et al. 1992). Daher ist der Begriff nicht geeignet, ein bestimmtes Retinoid zu beschreiben. Nach Chytil (Chytil 1984) sollte der Begriff etwas strikter definiert werden und nur all-*trans*-Retinol und all-*trans*-Retinylester umfassen.

---

<sup>1</sup>International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry



### 1.2.3 Struktur natürlicher und synthetischer Retinoide

All-*trans*-Retinol (Retinol oder Vitamin-A-Alkohol) ist die Stammkomponente der Retinoide (s. Abbildung 1.1). Es handelt sich um einen primären Alkohol mit einer molekularen Masse von 286,5. Der systematische Name lautet (all-E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol. Unter den Gesamtbegriff „Vitamin A“ fallen außerdem noch Retinylester, die Konjugate des Alkohols mit Fettsäuren (z.B. Palmitin-, Stearin-, Öl- oder Linolsäure) darstellen. Die Oxidation des Alkohols führt zum all-*trans*-Retinaldehyd (all-*trans*-Retinal), das wiederum weiter oxidiert werden kann zu all-*trans*-Retinsäure (all-*trans*-RA, Tretinoin). Diese drei Retinoide stellen die wichtigsten Vertreter der natürlich vorkommenden Retinoide dar (s. Abbildung 1.1) und zählen zu den Retinoiden der ersten Generation. Die Struktur dieser Moleküle lässt sich generell in drei Abschnitte einteilen: Ein hydrophober  $\beta$ -Iononring, eine konjugierte Tetraen-Seitenkette und eine polare Endgruppe. Weitere natürliche Retinoide werden durch Isomerisierung, durch Phase-I- bzw. Phase-II-Metabolismus oder durch die bisher wenig aufgeklärte Umwandlung zu sog. *retro*-Retinoiden gebildet (s. 1.5.4). Die Isomerisierung - insbesondere von Retinsäuren - stellt eine wichtige Reaktion dar. Von der Retinsäure (RA) sind neben der all-*trans*-Form verschiedene Stellungen-Isomere bekannt (u.a. 9-*cis*-RA, 11-*cis*-RA, 13-*cis*-RA und 9,13-di-*cis*-RA). Auch von Retinol und Retinylestern sind Stellungen-Isomere beschrieben (Brinkmann et al. 1995).

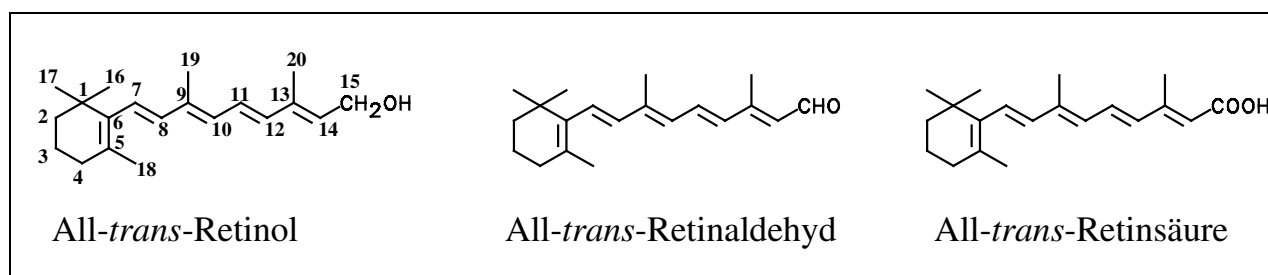


Abbildung 1.1: Strukturformeln wichtiger Retinoide.

Das Ersetzen des  $\beta$ -Iononrings durch einen substituierten Benzolring führt zu aromatischen Komponenten, von denen einige einen höheren therapeutischen Index als die natürlichen Retinoide aufweisen. Die so modifizierten, aktiven Komponenten gehören zu den Retinoiden der zweiten Generation. Ein Beispiel dafür stellt Etretinat dar (Klaus 1990).

## 1 - Einleitung

Retinoide der dritten Generation erhält man, indem die hohe Flexibilität der konjugierten Seitenkette natürlicher Retinoide durch den Einbau aromatischer Ringsysteme an verschiedenen Positionen so verringert wird, daß bestimmte starre Konformationen entstehen (CD437, s. Abbildung 1.2). Diese Strategie wurde kombiniert mit dem Einbau von Amiden, Sulfonamiden oder anderen Gruppen, so z.B. bei Am580 (Willhite et al. 1996) oder AGN191701.

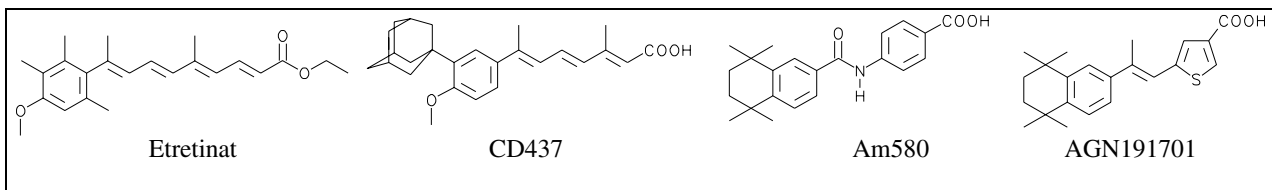


Abbildung 1.2: Strukturformeln einiger synthetischer Retinoide.

### 1.3 Retinoid-bindende Proteine und nukleäre Rezeptoren

#### 1.3.1 Retinol-bindendes Protein (*retinol-binding protein*, RBP)

Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit in Wasser müssen Retinoide - insbesondere Retinol - in wässriger Umgebung an Proteine gebunden sein. Im Blutkreislauf übernimmt Albumin als unspezifischer Träger für lipophile Komponenten diese Funktion. Für Retinol existiert im Plasma zudem ein spezifischer Träger, das Retinol-bindende Protein (*retinol-binding protein*, RBP). RBP ist ein monomeres Polypeptid mit einer molaren Masse von 21 kDa. Es ist das wichtigste extrazelluläre Retinoid-bindende Protein. Seine Funktion besteht darin, in der Leber gespeichertes Retinol aufzunehmen und über den Blutkreislauf zu Zielgeweben zu transportieren (s. 1.4.4). Unter physiologischen Bedingungen transportiert RBP spezifisch Retinol, *in vitro* konnten auch Retinaldehyd und all-*trans*-RA binden. An den Blutkreislauf abgegebenes holo-RBP (= Komplex aus Retinol und RBP) bindet an ein weiteres Protein, das Transthyretin (TTR, 55 kDa). Durch die Bildung dieser ternären Verbindung wird die renale Elimination des holo-RBP-Komplexes durch glomeruläre Filtration verhindert (Wolf 1995).

### 1.3.2 Zelluläre Bindeproteine

Neben dem extrazellulären Bindeprotein gibt es auch spezifische, intrazelluläre Trägerproteine für Retinoide. Es existieren vier zelluläre Retinoid-bindende Proteine dieser Art, die zur Familie der Fettsäure-bindenden Proteine (*fatty acid-binding protein*, FABP) zählen. Diese Proteine besitzen untereinander einen hohen Grad an Ähnlichkeit und sind auch im Laufe der Evolution in hohem Maße konserviert geblieben (Ong 1994). Es gibt zwei zelluläre Retinol-bindende Proteine, CRBP I und CRBP II (*cellular retinol-binding protein*). Beide können all-*trans*-Retinol, 13-*cis*-Retinol und all-*trans*-Retinaldehyd binden (Ong and Chytil 1975). CRBP I ist ubiquitär im Organismus verteilt und kommt in höchsten Konzentrationen in Leber, Niere und Nebenhoden vor (Porter et al. 1983; Kato et al. 1985). Im Gegensatz dazu wird CRBP II fast ausschließlich in den Villus-assoziierten Epithelzellen des Dünndarms exprimiert (Crow and Ong 1985; Ong 1984). Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß CRBP II eine spezielle Funktion bei der oralen Aufnahme von Vitamin A spielt.

Zwei weitere Proteine können intrazellulär Retinsäuren binden, CRABP I und CRABP II (*cellular retinoic acid-binding protein*). Beide weisen eine sehr hohe Bindungsaffinität zu all-*trans*-RA auf (Ong and Chytil 1975; Bailey and Siu 1988), wohingegen die Bindung von 13-*cis*-RA oder 9-*cis*-RA wesentlich geringer ausgeprägt ist (Fiorella et al. 1993; Allenby et al. 1993). CRABP I wird hauptsächlich in Gehirn, Augen, Hoden, Nebenhoden, Ovarien und Uterus exprimiert (Ong et al. 1982; Eriksson et al. 1987; Blaner et al. 1987), CRABP II fast ausschließlich in der Haut (Giguere et al. 1990). Beide Proteine spielen zudem während der Embryogenese eine entscheidende Rolle.

### 1.3.3 Nukleäre Retinoid-Rezeptoren

Ein Großteil der vielfältigen Wirkungen der Retinoide - insbesondere der Retinsäuren - wird über nukleäre Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zwei Familien nukleärer Retinoid-Rezeptoren wurden entdeckt: Die Retinsäure-Rezeptoren (*Retinoic Acid Receptors*, RAR) und die Retinoid X Rezeptoren (*Retinoid X Receptors*, RXR). Sie sind Mitglieder einer Superfamilie, zu denen der Thyroidhormon-Rezeptor (THR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und der Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptor (PPAR) sowie einige Rezeptoren mit bisher noch nicht identifizierten Liganden (*orphan receptors*) zählen. Bis jetzt wurden bei der Maus und beim

Menschen drei Gene identifiziert, die für hochgradig verwandte RAR-Proteine kodieren (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ), andere Homologe wurden in Vögeln und Amphibien entdeckt. Zusätzlich wurden ebenfalls drei verschiedene RXR exprimierende Gene (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ) in der Maus lokalisiert. Identische Homologe konnten auch im Menschen sowie in Ratten, Hühnern und Fröschen identifiziert werden (Leid et al. 1992; Mangelsdorf 1994). Durch Verwendung verschiedener Promotoren und aufgrund unterschiedlicher Möglichkeiten beim Splicen von Exons kann jedes RAR-Gen verschiedene Isoformen erzeugen. Bei den RXR-Genen sind nur bezüglich des RXR $\gamma$  der Maus verschiedene Isoformen bekannt.

Die Rezeptoren haben eine Masse von ca. 55 kDa, ihre Aminosäure-Sequenz kann in zahlreiche Regionen eingeteilt werden, von denen die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) sehr wichtig sind. Diese Domänen zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung unter den Mitgliedern einer Familie. Im Gegensatz dazu wurde eine wesentlich geringere Homologie zwischen RAR und RXR festgestellt, besonders in der LBD (Levin et al. 1992; Leid et al. 1992).

Retinoid-Rezeptoren wirken als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, dadurch daß sie an bestimmte DNA-Sequenzen (Response-Elemente) in der Promotorregion von Zielgenen binden (s. 1.5.1). All-*trans*-RA ist ein hochaffiner Ligand für den RAR, aber nicht für den RXR. 9-*cis*-RA bindet an beide Rezeptor-Familien (Levin et al. 1992; Heyman et al. 1992). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch einige nichtzyklische Terpene (z.B. Methopren) sowie Phytansäure RXR-Liganden darstellen, die aber nicht die RAR aktivieren (Harmon et al. 1995; LeMotte et al. 1996).

## **1.4 Aufnahme, Transport und Metabolismus von Vitamin A**

### **1.4.1 Vitamin-A-Quellen**

Tiere sind zur de novo-Synthese von Vitamin A nicht fähig. Sie müssen daher ihren Bedarf über die Nahrung decken. Karnivoren nehmen Vitamin A überwiegend in Form von Retinol oder Retinylestern auf, wohingegen Herbivoren Carotinoide, die Vorläufersubstanzen von Vitamin A, als Quelle verwenden. Retinylester sind Konjugate des Vitamin-A-Alkohols (Retinol) mit Fettsäuren, wobei überwiegend die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (16:0; s. Abbildung 1.3) und Stearinsäure (18:0) und in geringeren Mengen die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1),

## 1 - Einleitung

---

Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) zur Konjugation genutzt werden. Hauptnahrungsquellen für Retinol und Retinylester sind Leber, Fischleberöle (Lebertran), Eigelb sowie Milch und Milchprodukte. Tierische Leber enthält hierbei die mit Abstand größten Mengen Vitamin A. Die höchsten Vitamin-A-Gehalte in der Leber von Tieren sind bei Eisbären und Robben beschrieben worden (Ball et al. 1986; Rodahl and Moore 1943), die Gehalte schwankten zwischen 400 und 1000 mg/100 g Rohleber.

Carotinoide sind rote oder gelbe, fettlösliche Pigmente, die eine bestimmte Klasse von Kohlenwasserstoffen (Carotine) und ihre oxidierten Derivate (Xanthophylle) einschließen. Die Basisstruktur besteht aus 8 Isopreneinheiten. Es gibt mehr als 400 Carotinoide, jedoch besitzen nur ca. 50 davon Provitamin-A-Aktivität, d.h. können biologisch zu Vitamin A konvertiert werden. All-*trans*- $\beta$ -Carotin (s. Abbildung 1.3) hat unter diesen Verbindungen die größte Aktivität. Carotinoide werden durch photosynthetisch aktive Mikroorganismen und durch Pflanzen synthetisiert. Man findet sie vorwiegend in grünen und gelben Früchten oder Gemüsen (Olson 1994).

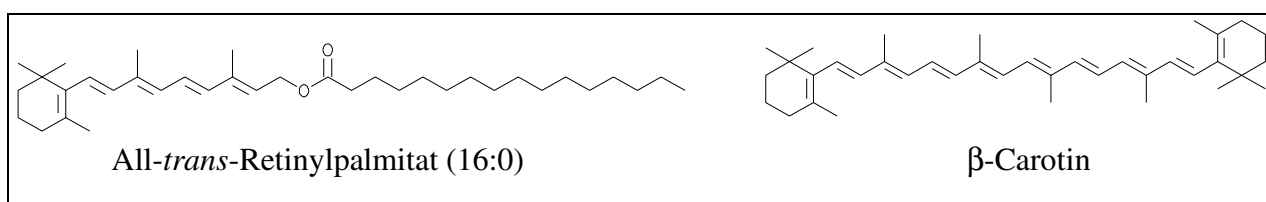


Abbildung 1.3: Strukturformeln von all-*trans*-Retinylpalmitat und  $\beta$ -Carotin.

Um die Abschätzung einer Vitamin-A-Aufnahme über Retinylester oder Carotinoide vergleichen zu können, wurde als Maß die Internationale Einheit (International Unit; IU) eingeführt (Bieri and McKenna 1981). 1 IU entspricht dabei 0,3  $\mu$ g all-*trans*-Retinol bzw. 1,6  $\mu$ g All-*trans*- $\beta$ -Carotin oder 3,2  $\mu$ g anderer Carotinoide.

### 1.4.2 Absorption und Metabolismus im Intestinaltrakt

Obwohl Retinylester die Hauptform des in der Nahrung vorkommenden Vitamin A darstellen, können sie nicht direkt aus der Nahrung aufgenommen werden. So wie bereits für andere veresterte Lipide - z. B. Cholesterylester - gezeigt wurde, müssen Retinylester im Darmlumen zunächst hydrolysiert werden, bevor sie in die Darmepithelzellen aufgenommen werden können.

## *1 - Einleitung*

---

Für diese luminale Hydrolyse der Retinylester wurden in der Ratte zwei separate Enzymaktivitäten beschrieben, die aus dem Pankreas-Sekret stammten (Erlanson and Borgstroem 1968). Eine dieser Enzymaktivitäten wurde der Pankreas-Lipase zugeschrieben. Die andere Aktivität schien jener der Carboxylester-Hydrolase (CEH) zu entsprechen, die auch unter den Namen Sterolester-Hydrolase oder Cholesterolester-Hydrolase (EC 3.1.1.13) bekannt ist. Es wurde angenommen, daß die CEH vorwiegend für die luminale Hydrolyse von Retinylestern verantwortlich ist (Goodman and Blaner 1984). Hydrolytische Aktivitäten konnten auch in Abwesenheit von Pankreas-Sekreten in Vesikeln der Bürstensaummembran gefunden werden (Mahadevan et al. 1963; David and Ganguly 1966). Diese Ergebnisse ließen zunächst vermuten, daß die Bürstensaummembran selbst intrinsische Enzyme zur Retinylester-Hydrolyse enthält. Es konnte jedoch später gezeigt werden, daß die bereits identifizierten Enzyme über eine Wechselwirkung mit Heparin sehr eng an die Bürstensaummembran binden und somit das Vorhandensein intrinsischer Enzyme vortäuschen können (Bosner et al. 1988; Bosner et al. 1989). Nach der Hydrolyse kann unverestertes Retinol, das auch in geringen Mengen als solches in der Nahrung vorkommt, über die Bürstensaummembran in die Epithelzellen des Dünndarms aufgenommen werden (s. Abbildung 1.4). Hierbei scheint ein spezifisches Trägerprotein eine Rolle zu spielen, da bei geringen Konzentrationen (0,2-0,3  $\mu\text{M}$  Retinol) eine hyperbolische Aufnahmekinetik beobachtet wurde, die erst bei höheren Konzentrationen sättigbar war (Hollander and Muralidhara 1977). Die Aufnahme erwies sich als Energie-unabhängiger, Träger-vermittelter Absorptionsprozeß. In der Ratte konnte eine Aufnahmerate von 40-50 pmol/min/10 cm Darmlänge ermittelt werden. *In vitro*-Experimente mit Caco-2-Zellen (, Zellen einer Zelllinie, die sich einem humanen Kolon-Adenokarzinom ableiten (Rousset 1986) und Enterozyten-ähnliche morphologische Eigenschaften aufweisen,) haben zu Ergebnissen geführt, die mit denen in der Ratte weitgehend übereinstimmten (Quick and Ong 1990). Aus den Ergebnissen dieser Experimente konnte geschlossen werden, daß bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Retinol ein sättigbarer Aufnahmeprozess ablief, während bei hohen, unphysiologischen Konzentrationen einfache, passive Diffusion stattfand. Es gibt einige Hinweise darauf, daß Proteine eine Rolle bei der Aufnahme von Retinol in die Enterozyten spielen. So konnte durch *in vitro*-Experimente gezeigt werden, daß  $\beta$ -Laktoglobulin Retinol bindet, und die Aufnahme des Komplexes in Enterozyten schneller abläuft als die freien Retinols (Rask and Peterson 1976; Said et al. 1989).

## 1 - Einleitung

$\beta$ -Laktoglobulin ist ein Protein, das in der Milch verschiedener Spezies vorkommt und sehr große strukturelle Ähnlichkeiten zu dem spezifischen Plasmaprotein RBP aufweist (Pervaiz and Brew 1985). Es ist also anzunehmen, daß ein spezifisches, bisher nicht identifiziertes Protein im Intestinaltrakt existiert, welches die Aufnahme von Retinol erleichtert.

Nach der Aufnahme von Retinol in die Enterozyten findet eine Wiederveresterung des Vitamin-A-Alkohols mit langkettigen Fettsäuren statt (s. Abbildung 1.4). Zwei mikrosomale Enzymaktivitäten wurden identifiziert, die diesen Prozeß ausführen: Eine Acyl-CoA:Retinol-Acyltransferase (ARAT) und eine Lecithin:Retinol-Acyltransferase (LRAT). ARAT kann freies Retinol *in vitro* verestern, ist aber nicht in der Lage, CRBP II-gebundenes Retinol als Substrat zu nutzen (Ong et al. 1987). LRAT hingegen vermag sowohl freies als auch gebundenes Retinol zu verestern (MacDonald and Ong 1988).

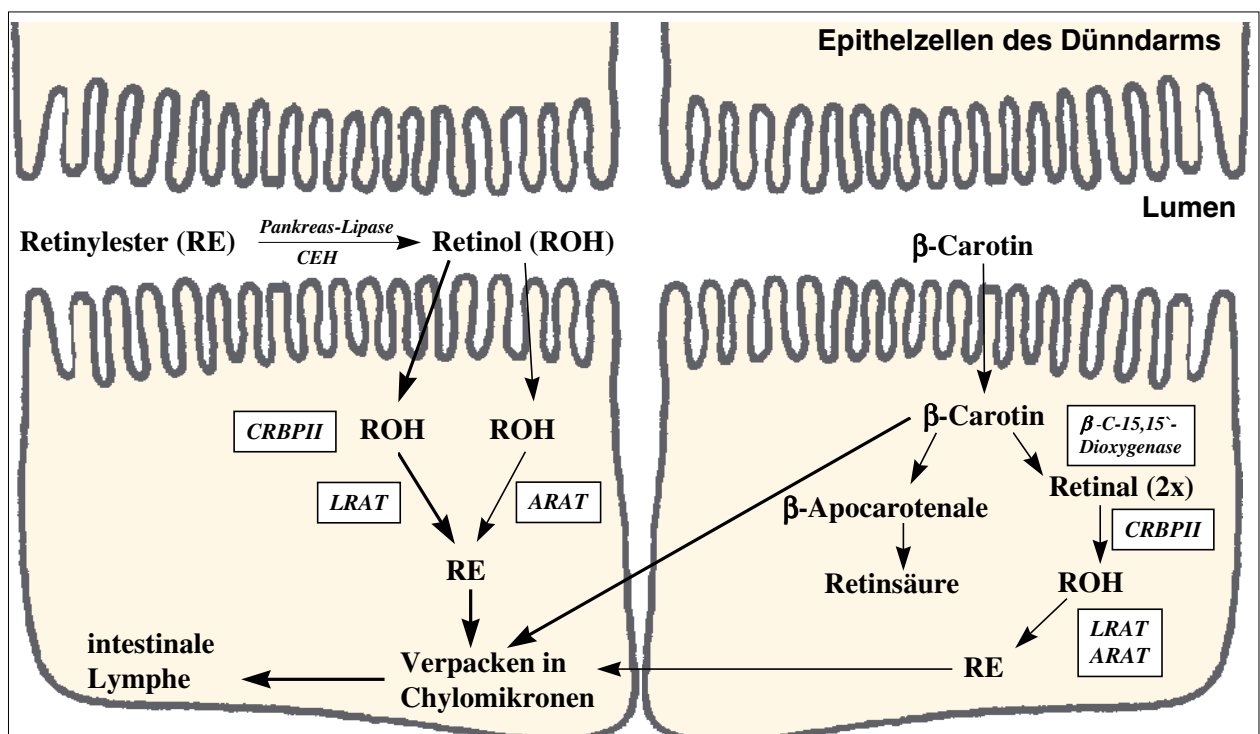


Abbildung 1.4: Absorption, Metabolismus und Transport von Vitamin A und  $\beta$ -Carotin im Gastrointestinaltrakt (Erklärungen im Text).

## *1 - Einleitung*

---

Da unter physiologischen Bedingungen nahezu das gesamte Retinol an CRBP II gebunden ist, wurde postuliert, daß LRAT hauptsächlich während der Aufnahme normaler Dosen die Veresterung durchführt, wohingegen ARAT nur überschüssiges Retinol nach Aufnahme hoher Vitamin-A-Dosen und CRBP II-Sättigung verestert (Blomhoff et al. 1992).

$\beta$ -Carotin wird in unveränderter Form durch passive Diffusion in die Darmzellen aufgenommen und dort umgewandelt. Zwei verschiedene enzymatische Mechanismen sind für diese Biokonversion bisher beschrieben: (a)  $\beta$ -Carotin wird zentral durch die cytosolische  *$\beta$ -Carotinoid-15,15'-Dioxygenase* zu zwei Molekülen Retinal gespalten (Huang and Goodman 1965) oder (b) durch exzentrische Spaltung an verschiedenen Doppelbindungen in  $\beta$ -Apocarotenale überführt, aus denen dann Retinsäure entstehen kann (Wang et al. 1991; Sharma et al. 1977). In der erstgenannten Reaktion wird das entstandene Retinaldehyd, das entweder frei oder an CRBP II gebunden vorliegt, durch eine mikrosomale Reduktase-Aktivität zu Retinol umgewandelt, das dann wiederum verestert wird (Kakkad and Ong 1988). Der Mensch transportiert außerdem ein Großteil aufgenommener Carotinoide in unveränderter Form, wohingegen die Ratte Carotinoide nahezu vollständig konvertiert (Shapiro et al. 1984).

Nach der Bildung von Retinylestern werden diese zusammen mit Triglyzeriden, Carotinoiden, Phospholipiden, anderen fettlöslichen Vitaminen und spezifischen Apolipoproteinen in Chylomikronen verpackt, die anschließend in die intestinale Lymphe entlassen werden. Diese Chylomikronen gelangen dann in den allgemeinen Blutkreislauf, wo sie nach einigen biochemischen Prozessen (u.a. Triglyzerid-Hydrolyse und Apolipoprotein-Austausch) in Chylomikronen-Remnants umformiert werden (Green and Glickman 1981). Während dieser Umwandlung verbleiben die Retinylester überwiegend in den Chylomikronen-Remnants (s. Abbildung 1.5).

Andere oral verabreichte Retinoide, wie z.B. die therapeutisch wirksamen Formen Tretinoin (all-*trans*-RA) oder Isotretinoin (13-*cis*-RA), werden durch passive Diffusion in das Dünndarmepithel aufgenommen und anschließend an die Portalvene abgegeben, von wo aus sie nach Passage der Leber gebunden an Albumin in den allgemeinen Blutkreislauf gelangen (Blaner and Olson 1994).



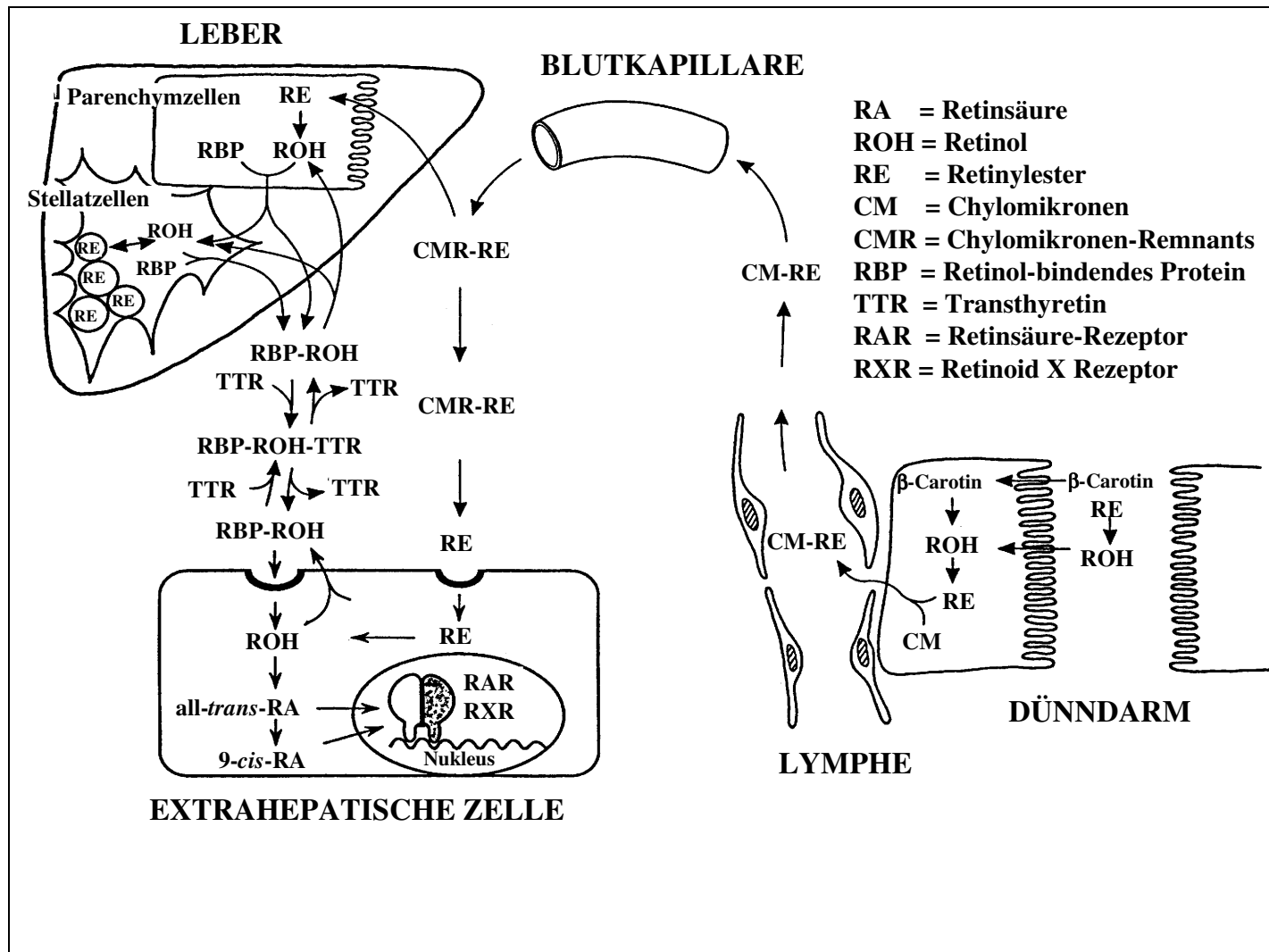


Abbildung 1.5: Absorption, Transport und Metabolismus von Vitamin A.

Retinylester aus der Nahrung werden intraluminal zu Retinol hydrolysiert, das dann in die Darmzellen aufgenommen wird. Dort wird es wiederverestert, in Chylomikronen (CM) verpackt und über die Lymphe abtransportiert. Nach Prozessierung der CM entstehen Chylomikronen-Remnants (CMR), die in die Parenchymzellen der Leber aufgenommen werden. Dort werden Retinylester hydrolysiert, Retinol wird gebunden an RBP in die Kupfer-Sternzellen abgegeben und dort gespeichert. Bei Bedarf wird RBP gebundenes Retinol an die systemische Zirkulation abgegeben und dort an TTR gebunden. Nach Aufnahme in extrahepatische Zellen kann Retinol zu den aktiven Retinsäuren metabolisiert werden, die dann im Nukleus als Transkriptionsfaktoren wirken.

### **1.4.3 Transport in die Leber, hepatischer Metabolismus und Speicherung**

Ein geringer Anteil der Retinylester aus Chylomikronen-Remnants wird von extrahepatischen Zellen des Fettgewebes, der Skelettmuskeln, der Niere sowie des Knochenmarks aufgenommen (Blomhoff et al. 1992). Der Hauptteil wird jedoch in den Parenchymzellen der Leber (Hepatozyten) freigesetzt (s. Abbildung 1.5). Anschließend findet an der Plasmamembran oder in frühen Endosomen der Parenchymzellen eine Hydrolyse der Retinylester statt (Harrison and Gad 1989). Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose wird Retinol anschließend in die Zelle aufgenommen und zum endoplasmatischen Retikulum transportiert (Blomhoff et al. 1985). Dort wird es an RBP (nicht an CRBP) gebunden, das gebundene Retinol wird anschließend wieder sequestriert (Ronne et al. 1983) und in die anhängenden Kupfer-Sternzellen der Leber transportiert. Da die Kupfer-Sternzellen der Leber an RBP-gebundenes Retinol aufnehmen können, wird vermutet, daß RBP den Retinol-Transport von den Parenchymzellen durch die interstitielle Flüssigkeit zu den Kupfer-Sternzellen vermittelt, ohne daß dieser Komplex in den allgemeinen Blutkreislauf gelangt (Blomhoff et al. 1985). In den Kupfer-Sternzellen wird der Komplex Retinol-RBP (= holo-RBP) gelöst und freies Retinol durch die hepatischen Enzyme LRAT und ARAT in ähnlicher Weise wie im Dünndarm wiederverestert und in den Kupfer-Sternzellen gespeichert.

### **1.4.4 Mobilisierung aus der Leber und Aufnahme in extrahepatische Zellen**

In Säugetieren befinden sich ca. 50-80% des gesamten Vitamin A (Retinol und Retinylester) in der Leber. Die Kupfer-Sternzellen der Leber enthalten von diesem Anteil ca. 90-95%. Nahezu das gesamte Vitamin A (98%) in den Kupfer-Sternzellen liegt in der Esterform vor und ist in Lipidtröpfchen verpackt (Blomhoff 1994). Die normale Vitamin-A-Reserve in den Kupfer-Sternzellen ist ausreichend, um den gesamten Organismus über mehrere Monate zu versorgen. Hydrolyse der gespeicherten Retinylester ist Voraussetzung für die Freisetzung von Vitamin A aus der Leber. Eine Retinylester-Hydrolase wurde als verantwortliches Enzym beschrieben (Harrison and Gad 1989). Es konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse endogener Retinylester in Rattenleber-Mikrosomen durch Zugabe von apo-CRBP (= freiem CRBP) stimulierbar ist (Boerman and Napoli 1991).

An RBP gebundenes Retinol wird anschließend entweder direkt aus den Kupfer-Sternzellen in die Blutzirkulation abgegeben oder zunächst in die Parenchymzellen transportiert und von dort sezerniert. Beide Mechanismen wurden als Möglichkeiten beschrieben (Blaner 1989; Blomhoff et al. 1992). Wie bereits unter 1.3.1 beschrieben, bindet holo-RBP an ein weiteres Protein, das Transthyretin (TTR). Untersuchungen an TTR-nullmutanten, homozygoten Mäusen haben gezeigt, daß TTR für die Mobilisierung von holo-RBP aus der Leber unerlässlich scheint (Wei et al. 1995). Die Plasma-Konzentrationen an Retinol weisen auch bei Vitamin-A-Defizienz oder bei Vitamin-A-Überschuß keine großen Schwankungen auf, da die Retinol-Freisetzung aus der Leber einer homöostatischen Kontrolle unterliegt.

Der Mechanismus, durch den holo-RBP von extrahepatischen Zellen aufgenommen wird, ist bisher nicht ganz geklärt. Es wurde vermutet, daß ein Zelloberflächen-Rezeptor, der RBP erkennt und anschließend freigesetztes Retinol in die Zelle aufnimmt, an dem Prozeß beteiligt sein könnte (Heller 1975; Sivaprasadarao and Findlay 1988). Eine Untersuchung der Gewebeverteilung dieses möglichen Oberflächenrezeptors zeigte, daß in der Plazenta, im Epithelgewebe des Retinalpigments, im Knochenmark und in der Niere hohe Bindungsaffinitäten für holo-RBP vorhanden sind (Smeland et al. 1995). Auf der anderen Seite gibt es Arbeiten, die die Existenz eines Oberflächenrezeptors in Frage stellen. Demnach wird Retinol aus dem Komplex in die wässrige Phase freigesetzt und durchdringt dann die Plasmamembran der Zelle ohne Mitwirkung eines Rezeptors (Noy and Xu 1990; Fex and Johannesson 1988). Bevor Retinol irreversibel abgebaut wird, zirkuliert es nach einem Kinetikmodell einige Male zwischen Plasma, Leber und extrahepatischen Geweben (Green et al. 1993).

### **1.4.5 Intrazellulärer Metabolismus von Vitamin A**

Der intrazelluläre Metabolismus von Vitamin A ist von einer Vielfältigkeit geprägt, die eine zusammenfassende Darstellung nur bedingt zuläßt. Ein Hauptaugenmerk gilt sicherlich der Biosynthese der aktiven Retinsäuren sowie dem Abbau dieser Metaboliten durch Phase-I- und Phase-II-Metabolismus. Um die Komplexität dieses Themenbereiches übersichtlich zusammenzufassen, wurde dem Anhang eine Abbildung über den Metabolismus von Vitamin A und über die daran beteiligten Enzyme beigelegt (s. Abbildung I im Anhang).

## *1 -Einleitung*

---

### 1.4.5.1 Biosynthese von Retinsäuren

In vielen biologischen Systemen stellt all-*trans*-RA (s. Abbildung 1.1) den aktiven Metaboliten von Vitamin A dar. Die Bildung von all-*trans*-RA aus Retinol ist ein sehr wichtiger Schritt, da dieser Metabolit in der Nahrung überhaupt nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Die endogenen Plasmakonzentrationen sind sehr niedrig und liegen beim Menschen um 1-2 ng/ml (Eckhoff and Nau 1990; Tang and Russell 1990).

Die Bildung von all-*trans*-RA aus Retinol läuft in einem zweistufigen Prozeß ab: Zunächst wird in einem reversiblen und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Retinol zu Retinaldehyd und anschließend in einem irreversiblen Schritt Retinaldehyd zu Retinsäure oxidiert.

#### Oxidation von Retinol zu Retinaldehyd

Nach Gabe von physiologischen Dosen Retinol an Ratten konnte die Biosynthese von all-*trans*-RA in der Leber nachgewiesen werden (Emerick et al. 1967). Später konnte diese Reaktion in nahezu allen Retinoid-abhängigen Geweben (Trachea, Haut, Hoden, Lunge) festgestellt werden (Frolik et al. 1981; Napoli and Race 1987; Connor and Smit 1987).

In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, daß die Oxidation zum Aldehyd durch cytosolische Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert wird (Boleda et al. 1993; Duester 1996; Napoli 1996). Dehydrogenasen kurzkettiger Alkohole (*short chain alcohol dehydrogenase*, SCAD), Mitglieder einer zweiten Enzym-Familie, wurden ebenfalls als für diesen Schritt physiologisch relevante Enzyme beschrieben (Duester 1996; Napoli 1996). Diese Enzyme kommen in Zellen und Geweben in relativ geringen Mengen vor und sind an Membranfraktionen gebunden. Viele dieser SCAD bevorzugen an CRBP I gebundenes Retinol als Substrat. Dies steht im Gegensatz zu den cytosolischen ADH, die nur freies Retinol umsetzen können. Beim Menschen existieren drei ADH-Isoenzyme, die *in vitro* NAD<sup>+</sup>-abhängig Retinol zu Retinaldehyd oxidieren können (ADH I, II und IV). Die humane ADH IV zeigte sich als katalytisch aktivstes Isoenzym, so daß ihm auch *in vivo* eine Beteiligung an der Biosynthese von Retinsäuren zugeschrieben wird. Das Expressionsmuster der ADH IV im Mausembryo unterstützt diese Hypothese, da es sowohl zeitlich als auch räumlich mit der Verteilung von all-*trans*-RA im sich entwickelnden Embryo übereinstimmt (Ang et al. 1996). Auch das ADH I-Isoenzym scheint eine endokrine Quelle für die Bereitstellung von all-*trans*-RA zur embryonalen Entwicklung zu sein (Haselbeck et al. 1997). Die Verwendung verschiedener Isomere des Retinols als Substrat zeigte, daß die humane

## *1 -Einleitung*

---

ADH IV all-*trans*-Retinol und 9-*cis*-Retinol, aber nicht 13-*cis*-Retinol zu oxidieren vermag (Allali et al. 1998). *In vitro*-Untersuchungen mit humaner, aufgereinigter ADH IV und aufgereinigtem CRBP I der Ratte ergaben, daß gebundenes Retinol nicht an die aktive Stelle der ADH IV gelangen kann (Kedishvili et al. 1998). Die Autoren schlossen daraus, daß der Beitrag von ADH-Isoenzymen an der Biosynthese von all-*trans*-RA von in der Zelle vorhandenem, freiem Retinol abhängt. Da unter physiologischen Bedingungen nahezu das gesamte Retinol an CRBP gebunden ist, ist die physiologische Bedeutung dieser Enzyme damit in Frage gestellt.

Von den mikrosomalen Enzymen der SCAD-Familie, die an CRBP I gebundenes Retinol als Substrat verwenden können, wurden bisher drei Retinol-Dehydrogenasen aus der Rattenleber geklont und charakterisiert (Posch et al. 1991; Chai et al. 1995; Boerman and Napoli 1995; Napoli 1996). Sie wurden als Retinol-Dehydrogenasen Typ I-III (RoDH I-III) bezeichnet und sind hauptsächlich in der Leber exprimiert. RoDH I und II kommen außerdem in Niere, Lunge, Gehirn und Testis der Ratte vor, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen als in der Leber. Auch in humaner Leber konnte eine mikrosomale Retinol-Dehydrogenase der SCAD-Familie (RoDH IV) identifiziert werden (Gough et al. 1998). Das Enzym zeigte außerdem eine hohe Substrataffinität zu Steroiden. Die Autoren schlossen daraus, daß einige der Enzyme, die an dem Metabolismus von Steroiden beteiligt sind, auch an der Biosynthese von Retinsäure mitwirken.

Es hat sich gezeigt, daß es eine Vielzahl von Enzymen gibt, die die Oxidation von Retinol katalysieren. Einige sind cytosolischen Ursprungs und verwenden ungebundenes Retinol als Substrat, andere sind membrangebunden und bevorzugen an CRBP I gebundenes Retinol.

### Oxidation von Retinaldehyd zu Retinsäure

Basierend auf Versuchen in der Maus konnte festgestellt werden, daß der zweite Oxidationsschritt bei der Bioaktivierung von Retinol zur Retinsäure in der Leber durch cytosolische, substratspezifische, NAD<sup>+</sup>-abhängige Aldehyd-Dehydrogenasen durchgeführt wird (Lee et al. 1991). Andere Arbeitsgruppen konnten vergleichbare Aktivitäten in cytosolischen Präparationen aus Niere, Testis und Lunge der Ratte beobachten (Bhat et al. 1988; Bhat et al. 1988). Kürzlich wurden die kinetischen Eigenschaften der humanen Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH<sub>1</sub>) aus cytosolischen Präparationen der Leber untersucht. Es wurde gezeigt, daß neben all-

## 1 -Einleitung

*trans*-Retinal auch 13-*cis*- und 9-*cis*-Retinal sehr gute Substrate für dieses Enzym sind (Bhat and Samaha 1999).

Eine Retinal-Dehydrogenase - als RalDH I bezeichnet - wurde aus Rattenleber isoliert, aufgereinigt und charakterisiert (Posch et al. 1992; el-Akawi and Napoli 1994). Diese cytosolische Dehydrogenase erkannte auch an CRBP I gebundenes Retinol und katalysierte die NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidation sowohl von all-*trans*- als auch von 9-*cis*-Retinal, wohingegen 13-*cis*-Retinal kein effektives Substrat war. Untersuchungen mit Lebermikrosomen des Kaninchens ergaben, daß die Cytochrom P450-Isoformen 1A2 und 3A6 ebenfalls in der Lage zu sein scheinen, Retinaldehyd zur entsprechenden Retinsäure zu oxidieren (Roberts et al. 1992).

Auch an dem zweiten Reaktionsschritt der Bioaktivierung von Retinol zur Retinsäure sind zumindestens *in vitro* zahlreiche cytosolische Dehydrogenasen beteiligt, deren Vorkommen in verschiedenen Geweben (Leber, Lunge, Niere, Testis) nachgewiesen wurde.

### Entstehung von *cis*-Isomeren der Retinsäure

Die Entstehung von *cis*-Isomeren der Retinsäure (s. Abbildung 1.6) hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen, seit bekannt ist, daß 9-*cis*-RA einer der endogenen Liganden für die Retinoid-Rezeptoren darstellt. 9-*cis*-RA konnte in der Leber und in der Niere unbehandelter Mäuse nachgewiesen werden (Heyman et al. 1992). 13-*cis*-RA wurde als endogener Metabolit in Humanplasma mit Konzentrationen von 1-2 ng/ml beschrieben (Eckhoff and Nau 1990; Tang and Russell 1990). Nach Vitamin-A-Supplementation konnte ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentrationen dieses Metaboliten festgestellt werden (Eckhoff et al. 1991).

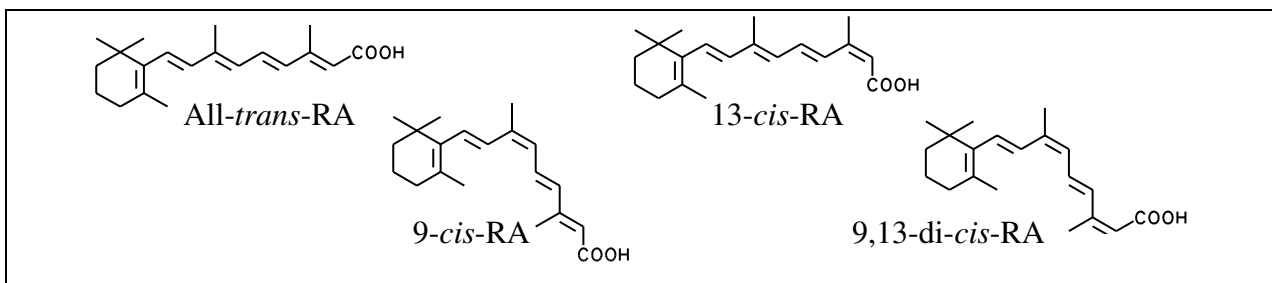


Abbildung 1.6: Strukturformeln der wichtigsten Retinsäure-Isomere.

## 1 -Einleitung

---

Ein weiteres Isomer, 9,13-di-*cis*-RA, wurde als endogenes Hauptisomer der Retinsäure in Plasma neugeborener Kälber gefunden (Horst et al. 1995; Horst et al. 1995). Gegenwärtig gibt es nur sehr wenig Informationen darüber, wie *cis*-Retinoide gebildet werden. Eine Ausnahme bildet die durch ein spezifisches Enzym katalysierte Isomerisierung von all-*trans*-Retinoiden zu den entsprechenden 11-*cis*-Isomeren im Sehprozeß. Im Sehzyklus findet die Isomerisierung auf der Ebene des Retinols und nicht des Retinaldehyds statt. Für die Bildung von *cis*-Retinsäuren - hier am Beispiel von 9-*cis*-RA - wurden drei mögliche Wege diskutiert:

- A. Eine direkte Isomerisierung von all-*trans*-RA zu 9-*cis*-RA (sowie anderen Isomeren) ist möglich. Es gibt Hinweise darauf, daß eine solche Reaktion nichtenzymatisch unter Beteiligung von Sulfhydrylgruppen abläuft (Shih et al. 1997; Shih et al. 1986; Urbach and Rando 1994). Im Gegensatz dazu deuten andere Ergebnisse darauf hin, daß die Biotransformation von 13-*cis*- und 9-*cis*-RA zu all-*trans*-RA unter Beteiligung von Isomerasen vollzogen wird (Chen and Juchau 1998). *In vitro*-Experimente mit rekombinanten, humanen Enzymen ergaben, daß es sich hierbei um Glutathion-S-Transferasen handeln könnte (Chen and Juchau 1998).
- B. Eine Oxidation von *cis*-Isomeren des Retinols zu den entsprechenden *cis*-Isomeren der Retinsäure entsprechend der Oxidation von all-*trans*-Retinol zu all-*trans*-RA erscheint ebenfalls plausibel. Das Vorkommen von *cis*-Isomeren des Retinols ist in der Niere der Ratte (Labrecque et al. 1995) sowie in der Leber von Schlachttieren (Brinkmann et al. 1995) und Fischen (Stanicher and Zonta 1984) beschrieben. Kürzlich konnte eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Retinol-Dehydrogenase geklont werden, die spezifisch 9-*cis*-Retinol aber nicht all-*trans*-Retinol oxidiert (Mertz et al. 1997). Diese 9-*cis*-Retinol-Dehydrogenase (9cRDH) ist ein Mitglied der SCAD-Enzymfamilie und wird in hohen Mengen in der Niere, aber auch in der Leber des Menschen exprimiert. Ein homologes Protein mit ähnlichen katalytischen Eigenschaften wurde auch in der Maus beschrieben (Gamble et al. 1999).
- C. Die Entstehung von 9-*cis*-RA kann durch die Spaltung von 9-*cis*- $\beta$ -Carotin aus der Nahrung zu 9-*cis*-Retinaldehyd mit anschließender Oxidation des Aldehyds vollzogen werden. *In vitro*-Studien mit Homogenaten aus Leber und Dünndarm haben diese Möglichkeit bestätigt (Nagao and Olson 1994). Auch *in vivo* konnte dieser Schritt im Frettchen, einem für den

## *1 -Einleitung*

---

Metabolismus von Carotinoiden verwendetem Modell, bewiesen werden (Hebuterne et al. 1995).

### 1.4.5.2 Phase-I-Metabolismus von Retinsäuren

Polare Metaboliten der Retinsäure-Isomere, die *in vivo* erzeugt werden, umfassen 5,6-epoxy-RA, 4-hydroxy-RA und 4-oxo-RA (Blaner and Olson 1994). Einige dieser Retinoide sind aktive Metaboliten in Bezug auf die Vermittlung der Funktion von Retinsäuren, andere sind vermutlich katabolische Produkte. In den letzten Jahren haben sich die Bemühungen verstärkt, die beteiligten enzymatischen Prozesse zu charakterisieren. Es scheint so, daß Mitglieder der Cytochrom P450-Familie eine Schlüsselrolle spielen. Die Bildung polarer Metaboliten aus Retinsäure wurde durch Enzymaktivitäten katalysiert, die sich im 100.000g-Sediment von Leber- bzw. Darmhomogenaten des Hamsters befanden (Roberts et al. 1979). Die Enzyme benötigten NADPH und Sauerstoff als Kofaktoren und waren durch Kohlenmonoxid inhibierbar. Spätere Untersuchungen ergaben, daß viele Cytochrom P450-Isoformen aus Kaninchenleber (2A4, 1A2, 2E1, 2E2, 2C3, 2G1 und 3A6) die 4-Hydroxylierung von Retinsäuren durchführen (Roberts et al. 1992). Diese Cytochrome konnten jedoch nicht die Bildung von 4-oxo-RA aus 4-hydroxy-RA katalysieren. Welche Mechanismen zur Bildung von 4-oxo-RA beitragen, ist bisher wenig untersucht, es ist jedoch zu vermuten, daß an diesem Schritt Dehydrogenasen beteiligt sind (Roberts et al. 1980).

In T47D-Zellen (humane Brustkrebszellen) konnten 4-Hydroxylase- und 18-Hydroxylase-Aktivitäten festgestellt werden. Letztere führt zur Bildung von 18-hydroxy-RA. Beide Aktivitäten waren durch Inkubation mit all-*trans*-RA induzierbar, schienen aber keiner der bekannten P450-Isoformen zugeordnet werden zu können.

Ein bis vor kurzem unbekanntes Cytochrom, CYP26, das in der Lage ist, Retinsäuren zu metabolisieren, wurde unabhängig von mehreren Gruppen entdeckt. Homologe von CYP 26 konnten sowohl beim Menschen (White et al. 1997) als auch bei der Maus (Abu et al. 1998) geklont werden. Beide katalysierten die Bildung von 4-hydroxy-, 18-hydroxy- und 4-oxo-RA.

Da an CRABP I gebundene all-*trans*-RA durch mikrosomale Fraktionen wesentlich effizienter metabolisiert wird als freie all-*trans*-RA, wurde vermutet, daß CRABP I in der Zelle eine wichtige Rolle beim Abbau dieses aktiven Metaboliten spielt (Fiorella and Napoli 1991). Von den hier beschriebenen Metaboliten konnte nur 13-*cis*-4-oxo-RA (s. Abbildung 1.7) als endogenes Retinoid in menschlichem Plasma nachgewiesen werden (Eckhoff and Nau 1990).



## 1 -Einleitung

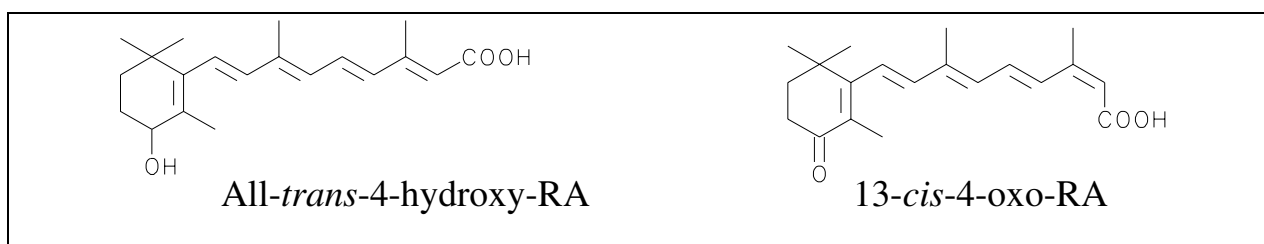


Abbildung 1.7: Strukturformeln von all-*trans*-4-hydroxy-RA und 13-*cis*-4-oxo-RA.

### 1.4.5.3 Phase-II-Metabolismus von Retinsäuren

Einen weiteren, wichtigen Schritt im Metabolismus von Retinsäuren stellt die Konjugation mit Glukuroniden dar. All-*trans*-Retinoyl- $\beta$ -D-glukuronid (all-*trans*-RAG; s. Abbildung 1.8) wurde als Metabolit von all-*trans*-RA erstmals in der Gallenflüssigkeit von Ratten gefunden (Dunagin-PE et al. 1966).

Spätere Studien ergaben, daß die intestinale Mukosa die aktivste Stelle für die Synthese von all-*trans*-RAG nach oraler Gabe physiologischer oder pharmakologischer Dosen all-*trans*-RA war (Zile et al. 1982; Cullum and Zile 1985; Barua et al. 1991). Ein Teil der über die Galle in den Darm ausgeschiedenen Glukuronide werden über den enterohepatischen Kreislauf zurück zur Leber transportiert (Swanson et al. 1981).

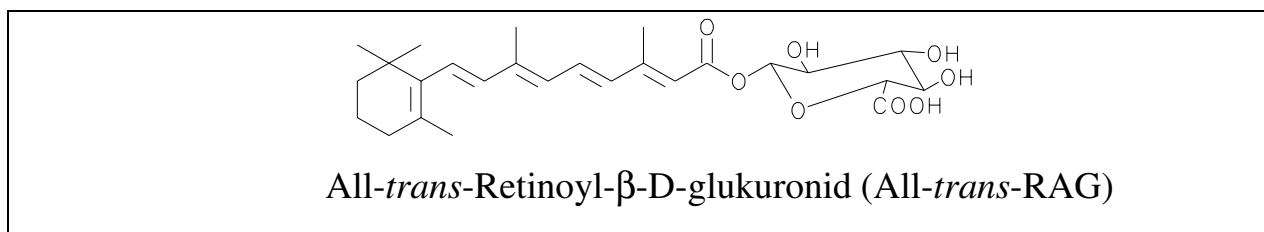


Abbildung 1.8: Strukturformel von all-*trans*-RAG.

Die  $\beta$ -Glukuronidierung von RA-Isomeren wird durch eine mikrosomale UDP-Glukuronosyl-Transferase (UGT) im Dünndarm, in der Leber, in der Niere und in anderen Geweben ermöglicht (Miller and DeLuca 1986; Salyers et al. 1993; Sass et al. 1994). All-*trans*-RAG wurde endogen in menschlichem Plasma nachgewiesen (Barua and Olson 1986), andere Arbeitsgruppen konnten das Vorkommen von Retinoid-Glukuroniden im Plasma sowohl endogen als auch nach Gabe von Retinoiden nicht bestätigen (Tang and Russell 1990; Eckhoff et al. 1991). Nach oraler Gabe von 9-*cis*-RA an menschliche Probanden konnten jedoch Retinoid-Glukuronide im Harn

## 1 -Einleitung

nachgewiesen werden (Sass et al. 1995). Eine Erklärung dafür könnte sein, daß das beim Menschen für die Glukuronidierung von Retinoiden verantwortliche Isoenzym überwiegend in der Niere und nur in ganz geringen Mengen in der Leber exprimiert wird (Ebner und Burchell 1993; Sutherland et al. 1993; Wooster et al. 1993). Dennoch konnten auch in humaner Gallenflüssigkeit die Glukuronide der Phase-I-Metaboliten 13-*cis*-4-oxo-RA, 13-*cis*-16-hydroxy-RA und 13-*cis*-18-hydroxy-RA nachgewiesen werden (Vane et al. 1990). Nach Gabe pharmakologischer Dosen von all-*trans*-RA oder 13-*cis*-RA wurden jedoch hohe Konzentrationen der entsprechenden RAG-Isomere im Plasma von Affen oder Mäusen gefunden (Creech et al. 1991; Kraft et al. 1991).

### 1.4.5.4 Metabolismus von Retinol zu *retro*-Retinoiden

Eine andere Gruppe von Metaboliten, die aus Retinol gebildet werden können, stellen die *retro*-Retinoide dar. *Retro*-Retinoide sind durch eine planare Konfiguration charakterisiert, die vom Ring bis zum Schwanz der Polyen-Kette reicht. Durch die Neuordnung des Doppelbindung-Systems wird der Cyclohexenylring an die Doppelbindung des Polyen-Schwanzes fixiert. Eines dieser *retro*-Retinoide, 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR; s. Abbildung 1.9) spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation von B-Lymphozyten sowie bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Buck et al. 1991). Lymphozyten in Kultur konnten diesen Metaboliten aus Retinol bilden. Anhydroretinol (AR), das bereits 1939 in Lebertran identifiziert wurde, ist 14-HRR strukturell sehr ähnlich, schien aber die Proliferation von B-Lymphozyten zu inhibieren und die Aktivierung von T-Lymphozyten zu blockieren (Buck et al. 1993).

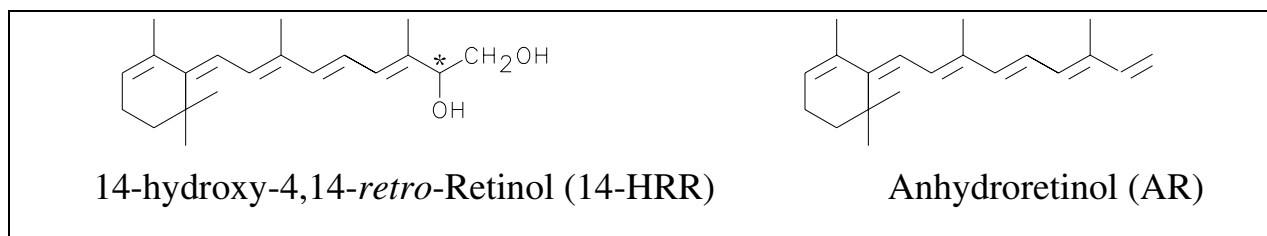


Abbildung 1.9: Strukturformeln der *retro*-Retinoide 14-HRR und AR.

14-HRR wurde erstmals auch als *in vivo*-Metabolit in trächtigen Mäusen, Ratten und Kaninchen nach Gabe von Vitamin A beschrieben (Tzimas et al. 1996). Nach topischer Applikation von

## 1 -Einleitung

Retinol an Mäuse konnte dieser Metabolit auch in der Haut nachgewiesen werden (Sass et al. 1996). Es stellte sich heraus, daß sich dieser Metabolit vorzugsweise in maternalen und embryonalen Geweben anreichert und nur in geringen Konzentrationen im Plasma vorkommt. Wie die Biosynthese von 14-HRR und AR aus Retinol abläuft und über welche Mechanismen diese Metaboliten auf das Immunsystem wirken, ist bisher nicht geklärt.

### 1.4.5.5 Bildung anderer Metabolite aus Retinol

Die Dehydrogenierung von Retinol an der C-3- und C-4-Position im Cyclohexenylring führt zu der Bildung von 3,4-Didehydroretinol (ddROH; s. Abbildung 1.10), das auch als Vitamin A<sub>2</sub> bekannt ist. Durch zweistufige Oxidation entsteht 3,4-Didehydroretinsäure (ddRA). Dieser Metabolismus wurde in der sich entwickelnden Gewebeknospe des Hühnchen-Embryos nach lokaler Gabe von Retinol nachvollzogen (Thaller and Eichele 1988). Beide Metaboliten wurden in Hühner-Embryonen auch endogen nachgewiesen (Thaller and Eichele 1990). Humane Keratinozyten in Kultur bildeten aus Retinol ebenfalls ddROH (Randolph and Simon 1993). In erwachsenen Säugetieren zeigt ddROH eine eingeschränkte Gewebeverteilung, lediglich in der Haut konnten meßbare Mengen gefunden werden (Vahlquist 1982). Süßwasserfische enthalten höhere Mengen ddROH als Retinol und unterscheiden sich dadurch von marinen Fischen, die höhere Retinol- als ddROH-Gehalte aufweisen (Stancher and Zonta 1984).

Es hat sich gezeigt, daß Retinol nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen in Analogie zu den Retinsäuren zu 4-hydroxy-Retinol metabolisiert werden kann (Leo et al. 1989). Später wurde im Kaninchen die Beteiligung mehrerer Isoformen der P450-Enzyme an dieser Reaktion nachgewiesen (Roberts et al. 1992).

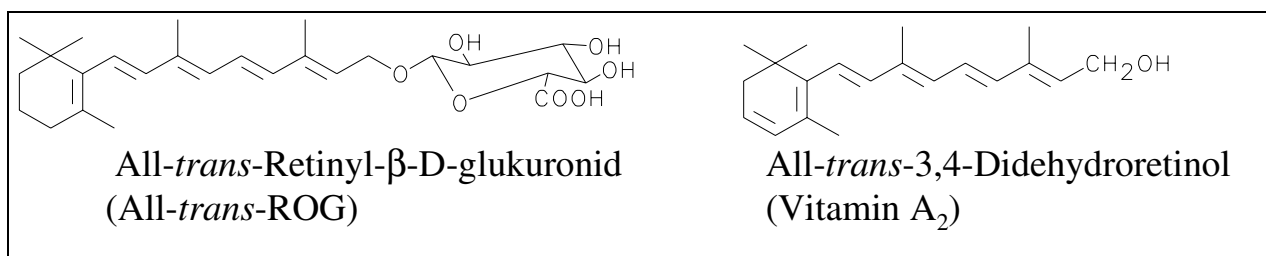


Abbildung 1.10: Strukturformeln von all-trans-ROG und all-trans-3,4-Didehydroretinol.

Ebenso wie die Retinsäuren kann Retinol im Phase-II-Metabolismus mit Glukuronsäure zu Retinyl- $\beta$ -D-glukuronid (ROG; s. Abbildung 1.10) konjugiert werden. In einer Studie konnte ROG in geringen Konzentrationen in Humanplasma nachgewiesen werden (Barua et al. 1989). Es wurde in vivo leicht zu Retinol hydrolysiert (Barua et al. 1988). Weiterhin wurde ROG als ein Hauptmetabolit in Plasma von Affen nach Gabe pharmakologischer Dosen Retinol identifiziert (Eckhoff et al. 1990; Eckhoff et al. 1991).

### 1.5 Wirkungsmechanismen von Retinoiden

#### 1.5.1 Genregulation durch Retinoide und Retinoid-Rezeptoren

Die Regulierung der Genexpression durch Retinoide und ihre Rezeptoren kann entweder transkriptional oder posttranskriptional erfolgen. Auf der transkriptionalen Ebene können Retinoid-Effekte durch Wechselwirkungen eines Retinoid-Rezeptors mit Retinoid-Response-Elementen (RARE oder RXRE) eines Gens vermittelt werden. Einen Überblick über die Signalwege ist vereinfacht in Abbildung 1.11 dargestellt. Die metabolischen Aspekte sind bereits in Abschnitt 1.4.5 behandelt worden. Sobald *all-trans*-RA oder *9-cis*-RA im Cytoplasma einer Zelle vorliegen, gelangen sie über einen noch nicht bekannten Mechanismus in den Nukleus und binden dort an die entsprechenden Rezeptoren. Eine hochaffine Bindung eines RAR an eine RARE setzt eine Heterodimerisierung mit einem RXR voraus. RAR/RXR-Heterodimere binden an die meisten RARE und können somit in Gegenwart von *all-trans*-RA oder sehr geringen Konzentrationen *9-cis*-RA als Transkriptionsaktivatoren fungieren. Im Gegensatz dazu kann eine DNA-Bindung der Rezeptoren in Abwesenheit der Liganden zu einer Genrepression führen. Liegen hohe Konzentrationen an *9-cis*-RA vor, so wird die Bildung von RXR-Homodimeren bevorzugt, die dann an RXRE binden. Die meisten RARE und RXRE bestehen aus direkten Wiederholungen der Halbelementen-Sequenz A(G)GGTCA mit einem Abstand von einem, zwei oder fünf Basenpaaren (Mangelsdorf et al. 1994). Unter den RA-responsiven Genen mit einem RARE in der Promotor-Region gibt es eine große Anzahl, die für Retinoid-bindende Proteine kodieren (mCRBP, mCRABP II, mRAR $\alpha$ 2, hRAR $\alpha$ 2, mRAR $\beta$ 2, hRAR $\beta$ 2, hRAR $\gamma$ ; m=Maus, h=Mensch). Weitere Gene sind die humane ADH3 sowie Laminin B1 und die Homöoboxgene Hoxa-1 bzw. Hoxd-4 der Maus. Außerdem enthalten die Gene von CRBP II der Ratte, CRABP II der Maus und das humane Apolipoprotein A1 ein RXRE in ihren Promotoren (Giguere 1994).

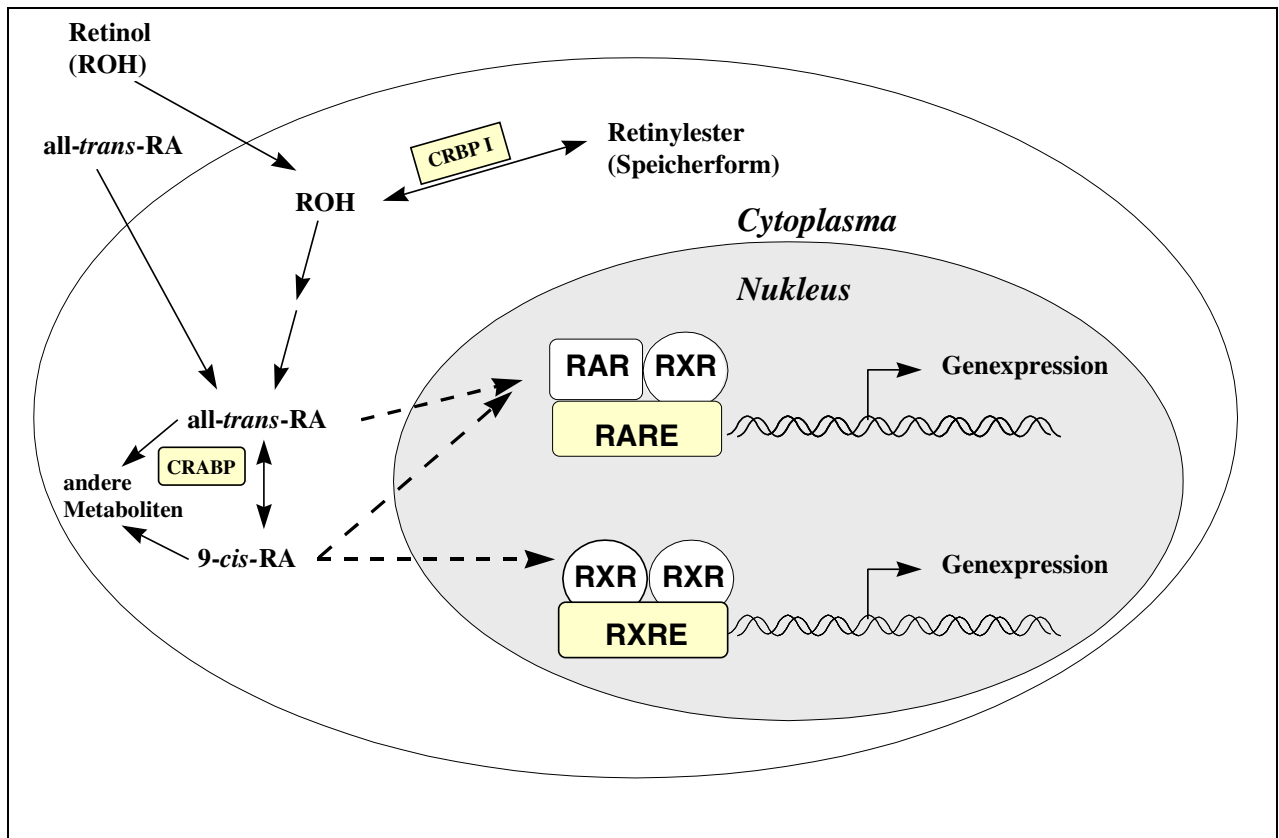


Abbildung 1.11: Intrazellulärer Metabolismus von Retinol zu aktiven RA-Isomeren und deren Wirkung als Liganden für nukleäre Transkriptionsfaktoren.

Es zeigte sich später, daß der RXR bei der Signaltransduktion die Rolle eines „Master-Regulators“ spielt, da er auch als Heterodimerpartner für andere Rezeptoren der Steroid-/Thyroidhormon-Familie fungiert, so z.B. für den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), den Thyroidhormon-Rezeptor (THR) und den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptor (PPAR). Der RXR kann einerseits bei Abwesenheit des Liganden als stiller Partner fungieren, andererseits mit gebundenem Liganden als aktiver Heterodimerpartner zur Signaltransduktion beitragen.

### 1.5.2 Andere Mechanismen

Der Sehprozeß stellt ein System dar, in dem die Wirkung von Retinoiden nicht über nukleäre Rezeptoren vermittelt wird. Die Photosensitivität von Insekten, Krustazeen, Arthropoden, Cephalopoden und Vertebraten basiert auf der Isomerisierung ein- und desselben Moleküls. In jedem Organismus besteht das für die Absorption von Licht verantwortliche Pigment aus Retinaldehyd, das als prothetische Gruppe über ein Aldimin an ein Membranprotein gebunden ist.

## *1 -Einleitung*

---

Der verantwortliche Retinoid-Metabolit in diesem System ist das Chromophor 11-*cis*-Retinaldehyd. Unter Lichteinfluß findet eine Isomerisierung zu all-*trans*-Retinaldehyd statt. Diese Isomerisierung zieht eine Änderung der Konformation des Pigment-Proteins (Rhodopsin), eine Dissoziation des Pigment-Chromophor-Komplexes sowie die Stimulation einer Signalkaskade nach sich, die letztendlich in der Erzeugung eines Nervenimpulses endet. Das entstandene all-*trans*-Retinaldehyd wird in den Photorezeptorzellen der Retina und dem anhängenden Epithelgewebe wieder zu 11-*cis*-Retinaldehyd isomerisiert (Saari 1994; Rando 1994)

Die Acylierung von Proteinen durch all-*trans*-RA (Retinoylierung) scheint einen alternativen Mechanismus darzustellen, durch den Retinoide auf Zellen wirken können. Zahlreiche *in vitro*-Studien mit Säugetierzellen haben gezeigt, daß all-*trans*-RA zu einem Retinoyl-CoA-Zwischenprodukt umgewandelt werden kann. Das Retinoylgerüst kann dann auf Zielproteine übertragen werden, wie z.B. die cAMP-abhängige Proteinkinase in HL-60-Zellen sowie auf Cytokeratine aus humanen Keratinozyten (Takahashi and Breitman 1994). In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, daß auch andere Mitglieder der Isoprenoidfamilie (z.B. Farnesol, Geranylgeranol) kovalent an regulatorische Proteine (G-Proteine und *ras*-Onkogene) binden und deren Funktion beeinflussen können (Goldstein and Brown 1990).

Einige der toxischen Effekte von Retinol wurden seiner oberflächenaktiven, Detergentien-ähnlichen Aktivität zugeschrieben. Diese Hypothese stützt sich vor allem auf die Destabilisierung lysosomaler Membranen der Gewebsknospenanlage von Hühnerembryonen in Kultur. Eine weitere Arbeit beschreibt die Freisetzung lysosomaler Enzyme in die Blutzirkulation nach Gabe hoher Dosen Retinol oder all-*trans*-RA an Meerschweinchen (Roels et al. 1969). Außer bei extrem hohen Retinoid-Konzentrationen wird diesem Konzept aber keine relevante Bedeutung für die Toxizität von Retinoiden zugeschrieben (Armstrong et al. 1994).

### **1.6 Physiologische Funktionen von Retinoiden**

Vitamin A und seine Metaboliten sind essentiell für die Aufrechterhaltung einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung von Zellen, Sehprozeß, Reproduktion, Entwicklung des Immunsystems und Embryonalentwicklung.

### **1.6.1 Wachstum**

Aufwachsende Ratten, die mit einer Vitamin-A-defizienten Nahrung gefüttert wurden, wuchsen mit einer reduzierten Rate, bis sie ein gewisses Gewichtsplateau erreichten. In diesem Stadium waren die Serumkonzentrationen an Retinol sehr niedrig und die Leberspeicher nahezu verbraucht. Weiterführende Vitamin-A-Defizienz führte zu einem enormen Gewichtsverlust. Das Wachstum individueller Organe war schon vor Auftreten des Gewichtsverlusts beeinträchtigt (Underwood 1984). Die Gabe geringer Mengen *all-trans*-RA an Vitamin-A-defiziente Ratten führte zu einer Wiederherstellung des Wachstums (Zile and DeLuca 1968; Arens and van Dorp 1946). Zahlreiche der natürlichen Metaboliten von Retinol oder *all-trans*-RA wie z.B. 13-*cis*-RA, ROG und *all-trans*-RAG zeigten ebenfalls eine wachstumsfördernde Wirkung (Zile et al. 1967; Barua and Olson 1987).

### **1.6.2 Proliferation und Differenzierung von Epithelgeweben**

Die Effekte von Retinoiden auf verhornende (keratinisierende) Epithelzellen ist schon sehr ausführlich untersucht worden. 1925 zeigten Wolbach und Howe, daß Vitamin-A-Defizienz bei Ratten zu einem Ersatz differenzierten, reifen Epithels durch squamöses, keratinisierendes Gewebe führte (Wolbach and Howe 1925). Später wurde berichtet, daß in Kultur gehaltene Epidermis von Hühnern nach Behandlung mit Retinol oder Retinylacetat von einem keratinisierenden zu einem Schleim-absondernden Phenotyp wechselte (Fell and Mellanby 1953). Im Allgemeinen sind die Effekte von Retinoiden auf die Zellproliferation und -differenzierung sehr unterschiedlich, ihre Natur hängt von dem Differenzierungs-Status der Zelle ab.

### **1.6.3 Reproduktion**

Vitamin A ist essentiell für die Spermatogenese, Oogenese sowie für die plazentare und embryonale Entwicklung (Eskild and Hansson 1994). Frühe Studien über die Funktion von Vitamin A in der Reproduktion waren schwer zu interpretieren, da die Tiere bei Vitamin-A-Defizienz fast starben. Thompson et al. fanden bereits sehr früh heraus, daß *all-trans*-RA die Funktionen von Vitamin A in der Reproduktion defizienter Tiere nicht ausüben konnte (Thompson et al. 1964). Andererseits bewiesen die Expression von CRABP I und Retinsäure-Rezeptoren im Hoden (Blaner et al. 1987; Rees et al. 1989) sowie die Fähigkeit dieses Organs, Retinol zu *all-trans*-RA zu metabolisieren (Napoli 1994), daß *all-trans*-RA eine wichtige Rolle in

der Reproduktion spielt. Später konnte die Studie von Thompson et al. teilweise widerlegt werden. Allerdings wurde erst nach wiederholter Gabe pharmakologischer Dosen all-*trans*-RA an Vitamin-A-defiziente Ratten ein positiver Effekt auf die Spermatogenese festgestellt (van-Pelt and de-Rooij 1991). Es scheint so, daß all-*trans*-RA im Gegensatz zu Retinol die Blut-Hoden-Schranke nur unzureichend überwinden kann.

### **1.6.4 Sehprozeß**

Der Sehprozeß ist einer der bestuntersuchten Mechanismen in Bezug auf die Funktion von Vitamin A. Sowohl Retinol als auch Retinaldehyd, aber nicht Retinsäuren, können durch Defizienz hervorgerufene Defekte im Sehprozeß beheben (Wald 1934; Wald 1968; Dowling and Wald 1960). Das aktive Retinoid im Sehzyklus stellt 11-*cis*-Retinaldehyd dar (s. Abschnitt 1.5.2).

### **1.6.5 Immunfunktion**

Vitamin-A-Defizienz ist eine Hauptursache für die hohe Kindersterblichkeit in der Dritten Welt, die sich vor allem durch die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten bemerkbar macht. Epidemiologische Studien haben bewiesen, daß eine Vitamin-A-Supplementation bei erkrankten Kindern in Asien und Afrika zu einer signifikanten Reduktion der Sterblichkeit führte (Sommer 1994). Tierexperimentelle Studien haben aufgezeigt, daß in Vitamin-A-defizienten Tieren sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität geschwächt ist. Die Immunantwort wurde allerdings durch Gabe von Retinol wiederhergestellt (Ross and Hämmerling 1994). Die molekularen Mechanismen, die Grundlage der Wirkung von Vitamin A auf die Immunantwort sind, wurden bisher nicht geklärt. Die Expression von CRABP I und Retinsäure-Rezeptoren in Lymphozyten (Ross and Hämmerling 1994) und die in einigen Fällen immunstimulierende Wirkung von all-*trans*-RA (Dennert et al. 1979) lassen den Schluß zu, daß dieser Metabolit auch im Immunsystem wirksam ist. Ein anderer Metabolit von Retinol, 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR, s. Abschnitt 1.4.5), konnte die Proliferation von Lymphozyten in Kultur stimulieren und scheint damit ein sehr effizienter Ersatz für Retinol bei der Vermittlung immunstimulierender Aktivität zu sein (Buck et al. 1991; Garbe et al. 1992).



### **1.7 Retinoide als Therapeutika in der Dermatologie und Krebstherapie**

#### **1.7.1 Dermatologie**

Vitamin A wird schon seit mehr als 50 Jahren bei der Behandlung zahlreicher Hauterkrankungen (Hyperkeratinisierung, Hyperproliferation) eingesetzt. Aufgrund seiner sehr drastischen Nebenwirkungen (Symptome der Hypervitaminose; s. 1.8) wurde es später durch all-*trans*-RA (Tretinoin) ersetzt (Kligman et al. 1969; Stüttgen 1962). Die Suche nach Retinoiden mit höherem therapeutischen Index führte zum Einsatz von 13-*cis*-RA (Isotretinoin), Etreinat und Acitretin. Oral verabreichte 13-*cis*-RA stellte sich als sehr effektives Therapeutikum zur Behandlung cystischer Akne heraus (Peck et al. 1979). Die aromatischen Retinoide Etreinat und Acitretin (freie Säure von Etreinat) wurden zur systemischen Therapie von Psoriasis und Hautkrankheiten aufgrund von Störungen der Keratinisierung eingesetzt (Orfanos et al. 1987). Diese Retinoide zeichnen sich durch ihre anti-inflammatorische Aktivität aus und besitzen zusätzlich die Fähigkeit, die Keratinozyten-Differenzierung zu induzieren. Topisch applizierte all-*trans*-RA konnte außerdem klinische und histologische Symptome von durch Bestrahlung gealterter Haut zurückdrängen (Ellis et al. 1990). Ähnliche Effekte wurde durch topisch appliziertes Retinol oder Retinaldehyd erzielt (Saurat et al. 1994; Kang et al. 1995). Die Haut ist ein metabolisch sehr aktives Gewebe. Die Biosynthese von all-*trans*-RA aus Retinol und der weitere Metabolismus durch Cytochrom P450-Enzyme konnte in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden (Siegenthaler 1990; Duell et al. 1992). In der menschlichen Haut werden CRABP I sowie RAR und RXR exprimiert (Elder et al. 1992). Man vermutet daher, daß die therapeutische Wirkung über RAR/RXR-Heterodimere vermittelt wird.

#### **1.7.2 Krebsprävention und -therapie**

Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, daß Retinoide chemisch induzierte Kanzerogenese in einer Vielzahl von epithelialen Geweben unterdrücken können. Damit war der Grundstein für die klinische Anwendung von Retinoiden bei der Prävention und der Therapie von Hautkrebs gelegt (Bollag and Holdener 1992). All-*trans*-RA zeigte positive Effekte bei der Behandlung von promyelocytischer Leukämie (Huang et al. 1988). 13-*cis*-RA und Etreinat wurden in klinischen Studien zur Prävention verschiedener Krebsarten eingesetzt (Hong et al. 1990; Kraemer et al. 1988). Das synthetische Retinoid 4-hydroxyphenyl-Retinamid (4-HPR, Fenretinid) wurde zur

Prävention von Brustkrebs verabreicht (Costa et al. 1994). Die Antitumor-Aktivität von Retinoiden steht in den meisten Fällen in Zusammenhang mit ihrer Wirkung auf das Zellwachstum und die Differenzierung.

### **1.8 Toxizität von Retinoiden**

Die Aufnahme hoher Mengen Vitamin A erzeugt ein charakteristisches Toxizitätsbild (Hypervitaminose A) und kann in der Regel durch die Einnahme von Supplementen, aber auch durch den Verzehr von Leber oder Leberprodukten erfolgen. Akut-toxische Symptome können bei oraler Aufnahme von mehr als 1.000.000 IU Vitamin A auftreten, chronische Symptome sind nach täglichen Aufnahmen von 20.000-50.000 IU Vitamin A über einen längeren Zeitraum beschrieben worden (Hathcock et al. 1990). Über Vitamin-A-Toxizität wurde bereits zur Jahrhundertwende berichtet, nachdem Arktisforscher extrem Vitamin-A-reiche Polarbärenleber verzehrten (Rodahl and Moore 1943). Chronische Vitamin-A-Intoxikationen sind bei Erwachsenen nach Einnahme hochdosierter Supplemente (Geubel et al. 1991; Theiler et al. 1993; Kowalski et al. 1994), bei Kindern häufig nach mehrmaliger Verabreichung von Lebermahlzeiten beschrieben worden (Mahoney et al. 1980; Carpenter et al. 1987). Die drastischen Folgen solcher Intoxikationen äußerten sich in muskulo-skelettalen Beschwerden, morphologischen Veränderungen der Leber bis zu hepatotoxischen Symptomen sowie in Veränderungen der Haut. Mildere Erscheinungsformen machten sich durch Kopfschmerzen, Übelkeit und Bluthochdruck bemerkbar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus Schweden (Melhus et al. 1998) wurden erstmals adverse Effekte beschrieben, die auf die chronische Einnahme von geringen Mengen Vitamin A zurückzuführen waren. Es wurde festgestellt, daß die Einnahme von mehr als 1,5 mg Retinol/Tag (= 5.000 IU) über einen längeren Zeitraum verglichen mit einer Einnahme von nur 0,5 mg/Tag die Mineralien-Dichte in den Knochen um 6% reduzierte und das Risiko einer Hüftfraktur verdoppelte.

### 1.9 Retinoide in der Embryonalentwicklung

#### 1.9.1 Molekulare Mechanismen

Da Retinoid-Rezeptoren auch in embryonalem Gewebe weit verbreitet sind und in hohen Mengen exprimiert werden, spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Proliferation und der Differenzierung embryonaler Zellen. Die Hypothese, daß Retinoid-Rezeptoren sowohl an der normalen als auch an der abnormalen embryonalen Entwicklung beteiligt sind, wurde durch einige Studien bestätigt (Chambon 1993). Der RAR-Ligand *all-trans*-RA trat endogen im Embryo auf, wobei ein spezifisches Verteilungsmuster mit hohen Konzentrationen im Zentralnervensystem und in den Gewebeknospen zu beobachten war (Thaller and Eichele 1987; Durston et al. 1989; Scott-WJ et al. 1994). Die Rezeptoren der Familien RAR und RXR zeigten ebenfalls ein bestimmtes, räumliches und zeitliches Verteilungsmuster im sich entwickelnden Embryo (Dolle et al. 1990; Ruberte et al. 1991; Ruberte et al. 1993; Yamagata et al. 1994). Der RAR $\alpha$  wies ein nahezu ubiquitäres Vorkommen auf, wohingegen RAR $\beta$  und RAR $\gamma$  ein oft gegensätzliches, spezifisches Expressionsmuster zeigten. Es gibt zahlreiche Ansätze, um die Rolle individueller Rezeptor-Subtypen im Hinblick auf die Beteiligung an der embryonalen Entwicklung zu überprüfen. So sind Maus-Stämme beschrieben, in denen bestimmte Isoformen oder ganze Gene für verschiedene RAR oder RXR ausgeschaltet wurden (nullmutante bzw. knock-out Mäuse). Die Ausschaltung einer RAR $\alpha$ -Isoform in Mäusen führte zu keinem signifikanten Effekt auf die Entwicklung der Embryonen, so daß sich die Nachkommenschaft RAR $\alpha$ 1-nullmutanter Mäuse normal entwickelte. Gezielte Ausschaltung der gesamten RAR $\alpha$ -Gene führte zu einigen diskreten Defekten, z.B. auf die Geschlechtsorgane (Lufkin et al. 1993). Diese Ergebnisse waren wegen der ubiquitären Expression von RAR $\alpha$  im Embryo durchaus überraschend. Ebenso führte die Zerstörung anderer RAR- oder RXR-Isoformen nur zu relativ geringfügigen Effekten auf die Embryonalentwicklung. RAR $\gamma$ -nullmutante Mäuse zeigten einen normalen Knochen- und Knorpelbau sowie eine normale Entwicklung der Haut, obwohl dieser Rezeptor-Subtyp gerade dort spezifisch exprimiert war (Chambon 1993; Lohnes et al. 1993). Diese Ergebnisse verdeutlichten, daß ein hohes Maß an funktioneller Redundanz unter den RA-Rezeptoren vorlag. Außerdem konnte das Vorkommen eines Gentranskripts in einem bestimmten Gewebe nicht unbedingt mit seiner Unerläßlichkeit für die normale Entwicklung embryonaler Gewebeabschnitte gleichgesetzt werden. Aus diesen Gründen wurde eine Vielzahl doppelt-

## *1 -Einleitung*

---

mutanter Maus-Stämme erzeugt (Lohnes et al. 1994; Kastner et al. 1994; Luo et al. 1995; Mendelsohn et al. 1994). Ihre Fehlbildungen ähnelten denen, die bei einer Vitamin-A-Defizienz in Ratten auftraten (Wilson et al. 1953) und beinhalteten Mißbildungen der Augenanlagen, des Respirationstrakts, der Herzgefäße sowie des Urogenitalsystems.

Ein anderer Weg, um die Beteiligung von Rezeptor-Subtypen an der embryonalen Entwicklung zu untersuchen, wurde durch den Einsatz synthetischer Retinoid-Liganden eingeschlagen. Diese zeichneten sich dadurch aus, daß sie eine hohe Bindungsaffinität zu einem bestimmten Rezeptor aufwiesen und diesen auch transaktivierten. Nach Verabreichung teratogener Dosen selektiver RAR-Liganden an trächtige Mäuse wurden die resultierenden Fehlbildungen verglichen (Elmazar et al. 1996). Der RAR $\alpha$ -selektive Ligand (Am580) führte zu den stärksten und vielfältigsten Defekten. Dieses Ergebnis stimmte mit der weitreichenden Verteilung des Rezeptor-Subtyps im Embryo überein. Der RAR $\beta$ -selektive Ligand (CD2019) induzierte nur geringfügige Defekte, bei Gabe des RAR $\gamma$ -selektiven Liganden (CD437) zeigten sich die mildesten Fehlbildungen, die überwiegend dort auftraten, wo der RAR $\gamma$  auch exprimiert war, d.h. in den Knochen- und Knorpelanlagen.

Studien auf molekularer und zellulärer Ebene lassen den Schluß zu, daß eine Heterodimerisierung von Rezeptoren Voraussetzung für eine effiziente Bindung an die DNA und eine Transaktivierung von Zielgenen ist. In den meisten Fällen schienen RAR-RXR-Heterodimere die physiologisch aktive Form der Retinoid-Rezeptoren zu sein (Durand et al. 1992; Zhang and Pfahl 1993). Erste Untersuchungen zur Teratogenität bei Gabe von Rezeptor-selektiven RAR- und RXR-Liganden haben gezeigt, daß bestimmte Mißbildungen, die durch Gabe eines RAR $\alpha$ -Liganden (Am580) oder eines RAR $\gamma$ -Liganden (CD437) hervorgerufen wurden, durch gleichzeitige Gabe eines RXR-selektiven Liganden (LG1069, AGN191701) potenziert wurden (Elmazar et al. 1997). Die alleinige Gabe der RXR-Liganden führte zu keinen beobachtbaren Mißbildungen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen konnte man folgern, daß bestimmte Retinoid-induzierte Mißbildungen wie Spina bifida oder Mikrognathie durch ligandierte RAR $\alpha$ -RXR-Heterodimere hervorgerufen werden und andere teratogene Effekte (Exenzephalie und Gaumenspalte) durch RAR $\gamma$ -RXR-Heterodimere.

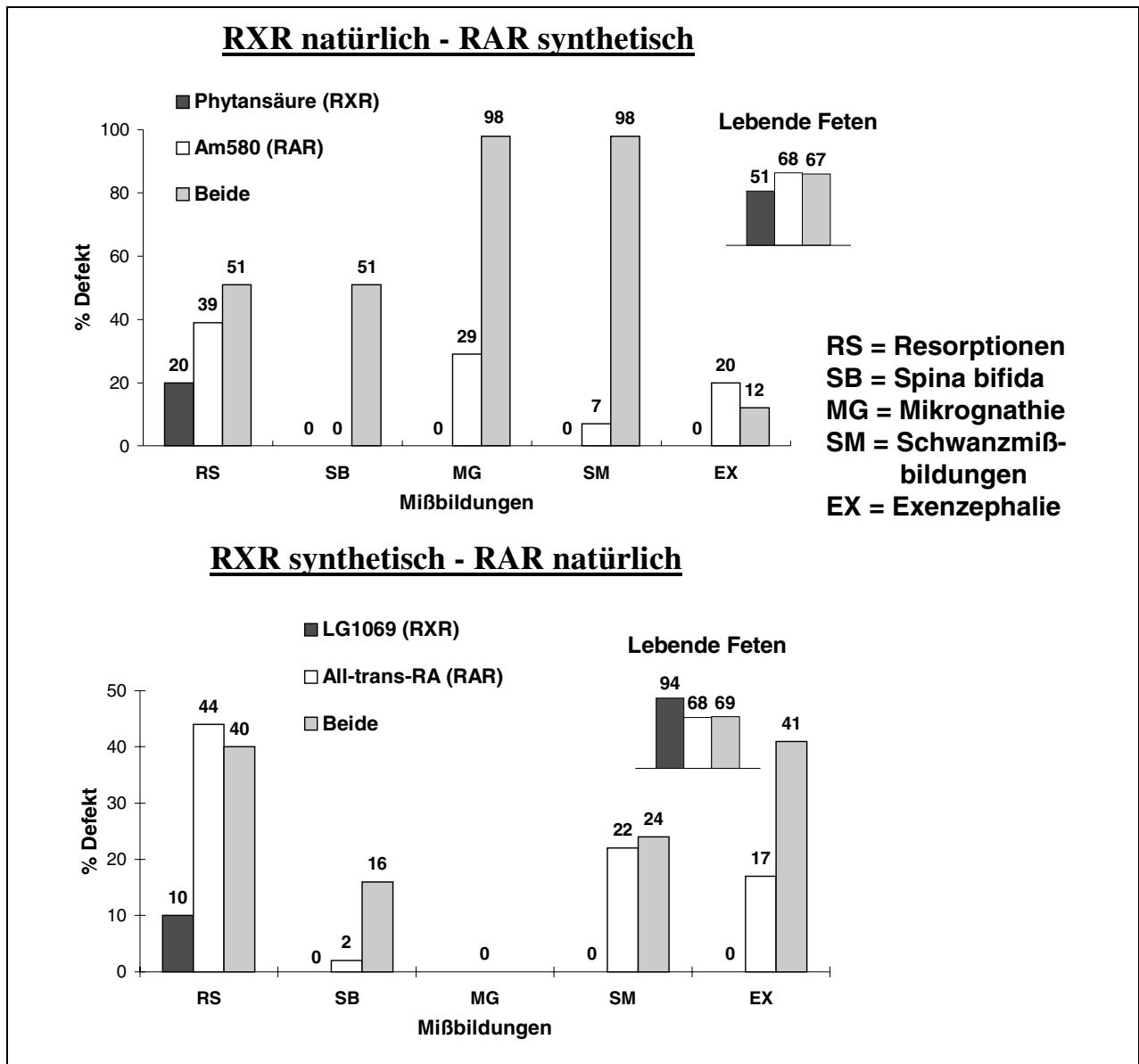


Abbildung 1.12: Potenzierung RAR-induzierter, teratogener Effekte<sup>1</sup> bei gleichzeitiger Gabe eines RXR-selektiven, natürlichen Liganden und eines RAR-selektiven, synthetischen Liganden (oben) oder umgekehrt (unten) an Gestationstag 8,25 der Maus.

Die Gabe des natürlichen RXR-Liganden Phytansäure mit dem synthetischen RAR $\alpha$ -Liganden führte zu einer ähnlichen Potenzierung RAR $\alpha$ -vermittelter Mißbildungen in der Maus. Ebenso konnte man die durch Gabe des natürlichen, unselektiven RAR-Agonisten *all-trans*-RA oder deren Muttersubstanz *all-trans*-Retinol hervorgerufenen teratogenen Effekte durch die

<sup>1</sup> Die Terminologie der Mißbildungen erfolgt im Methodenteil.

gleichzeitige Gabe des synthetischen RXR-Liganden LG1069 potenzieren (Elmazar und Nau 1998). Diese Resultate legten den Verdacht nahe, daß die gleichzeitige Gabe eines natürlichen RAR-Liganden (all-*trans*-RA) oder seines Vorläufers (all-*trans*-Retinol) und eines natürlichen RXR-Liganden (Phytansäure) oder seines Vorläufers (Phytol) ebenfalls zu synergistischen, teratogenen Effekten in der Maus führen könnten.

### 1.9.2 Vitamin-A-Defizienz

Die Unerläßlichkeit von Vitamin A für eine normale, embryonale Entwicklung wurde schon 1933 demonstriert, als trächtige Schweine, die Vitamin-A-defizient gefüttert wurden, Nachwuchs bekamen, der blind war und schwere Mißbildungen (Gaumenspalte, gespaltene Lippen) aufwies (Hale 1933). Vitamin-A-Defizienz vor und während der Trächtigkeit führte bei Ratten zu einer gesteigerten Embryoletalität und einem vielfältigen Mißbildungsmuster, das die Augen, das Urogenitalsystem, den Respirationstrakt, das Herz und die großen Blutgefäße betraf. Die Gabe von Retinol an Vitamin-A-defiziente Ratten im Verlauf der Trächtigkeit schützte vor nahezu allen Anzeichen eines embryonalen Vitamin-A-Defizienz-Syndroms (Wilson et al. 1953). Im Gegensatz dazu konnte die Gabe von all-*trans*-RA die Mortalitätsrate bei Vitamin-A-defizienten Rattenfeten nicht vermindern. Das ließ darauf schließen, daß Retinol selbst oder ein anderer Metabolit als all-*trans*-RA für die Entwicklung in der späten Phase der Trächtigkeit verantwortlich war (Thompson et al. 1964).

### 1.9.3 Vitamin-A-Überschuß

Der erste Bericht über die Teratogenität hoher Vitamin-A-Dosen erschien 1953 und basierte auf Experimenten mit Ratten (Cohlan 1953). Orale Dosen von 60 mg Retinol/kg Körpergewicht wurden trächtigen Ratten täglich von Gestationstag (GD) 2 bis 16 verabreicht. Diese Dosierung führte zu einer hohen Embryoletalität, aber auch zu schweren embryonalen Mißbildungen in der überlebenden Nachkommenschaft (Exenzephalie, Lippen- bzw. Gaumenspalte und Augendefekte). Zahlreiche Studien sind seitdem durchgeführt worden, die alle gezeigt haben, daß die Teratogenität von Vitamin A auch in anderen Spezies nachvollziehbar ist (Rosa et al. 1986; Nau et al. 1994; Geelen 1979). All-*trans*-RA stellte sich in Ratten und Mäusen gemessen an der Dosis zur Erzielung teratogener Effekte als ein wesentlich potenteres Teratogen heraus als Vitamin A (Retinol) selbst (Kochhar 1967).

Wesentliche Merkmale der Teratogenität von Retinoiden waren das breite Spektrum sowie die zeitliche Spezifität induzierter Effekte. Exposition der Embryonen im Frühstadium der Trächtigkeit führte zu kraniofazialen, kardiovaskulären und neuronalen Defekten, wohingegen zu späteren Zeitpunkten Mißbildungen der Gliedmaßen, der Gaumen sowie des Genitaltrakts zu beobachten waren (Kistler 1981; Shenefelt 1972).

### 1.9.4 Bedeutung von Metabolismus und Pharmakokinetik

Die embryotoxische Wirkung einer Substanz ist vorherbestimmt durch ihre eigene Aktivität, durch die Sensitivität des Embryos und letztendlich durch das Ausmaß der embryonalen Exposition gegenüber der Substanz oder seinen aktiven Metaboliten (Nau 1986). Um diese Faktoren abschätzen und gewichten zu können, sind pharmakokinetische und metabolische Studien sehr nützlich. Im Hinblick auf eine teratogene Wirkung von Retinoiden ist es wichtig, folgende Parameter für eine sinnvolle Risikoabschätzung in Betracht zu ziehen:

1. Die Bedeutung der metabolischen Aktivierung von Retinoiden: Aufgrund der hohen teratogenen Potenz von all-*trans*-RA in Mäusen (Eckhoff et al. 1989; Kochhar et al. 1988) wurde die Biotransformation von Retinol zu all-*trans*-RA als metabolische Aktivierung angesehen. Die Blockierung des oxidativen Metabolismus durch 4-Methylpyrazol vor Verabreichung einer teratogenen Dosis Retinol an trächtige Mäuse brachte nur eine teilweise Reduktion des teratogenen Effekts (Collins et al. 1992). Daraus wurde geschlossen, daß Retinol eine intrinsische, teratogene Aktivität besitzt oder in andere, bisher nicht identifizierte, aktive Metaboliten transformiert wird. Die Bildung von all-*trans*-RA, all-*trans*-4-oxo-RA und deren 13-*cis*-Isomere ist auch nach Gabe pharmakologischer Vitamin-A-Dosen an Affen (Eckhoff et al. 1991) oder Menschen (Eckhoff et al. 1991) beobachtet worden, so daß diese Stoffwechselwege als relevant für die Teratogenität von Vitamin A angesehen werden.
2. Die Anwendung pharmakokinetischer Parameter: Viele Substanzen werden in experimentellen Tierversuchen rasch eliminiert oder metabolisiert und weisen sehr kurze Halbwertszeiten auf. Daher unterscheiden sich Pharmakokinetiken zwischen Mensch und verschiedenen Tierspezies in einigen Fällen sehr deutlich (Nau 1995). Für eine quantitative Abschätzung der embryonalen Exposition in Zusammenhang mit möglichen teratogenen Effekten finden in der Regel zwei pharmakokinetische Parameter Anwendung, die maximale Konzentration im Verlauf einer Kinetik ( $C_{max}$ ) sowie die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area*

*under the concentration-time curve; AUC*). Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, daß AUC-Werte aktiver Retinoide, die in embryonalen Kompartimenten während sensibler Stadien der Trächtigkeit ermittelt wurden, sehr gut mit der beobachteten, teratogenen Aktivität korrelierten (Tzimas et al. 1997; Tzimas et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnten die ermittelten  $C_{\max}$ -Werte in Plasma und Embryo nur ungenügend mit der erzielten embryotoxischen Wirkung in Einklang gebracht werden.

### **1.10 Leberverzehr in der Schwangerschaft**

Auf der Basis von epidemiologischen Studien besteht beim Menschen der Verdacht einer teratogenen Wirkung von Vitamin A (Rosa et al. 1986; Rothman et al. 1995). Bis 1993 wurden 24 Fälle von embryonalen Mißbildungen berichtet, die auf eine Einnahme von mehr als 25.000 IU Vitamin A täglich zurückzuführen waren (Rosa 1993). Von den wenigen Fallberichten, die über kongenitale Mißbildungen aufgrund einer erhöhten Vitamin-A-Aufnahme durch die Mutter berichten, gab es bisher nur einen Fall, der auf den übermäßigen Verzehr von Leber zurückzuführen war (Rosa 1993). Allerdings ist 13-*cis*-RA (Isotretinoin), die als Medikament zur Therapie von schwerer Akne eingesetzt wird, beim Menschen nachweislich hochteratogen (Lammer et al. 1985; Rosa 1983).

Verschiedene nationale und internationale Organisationen haben aufgrund des Verdachts einer teratogenen Wirkung Empfehlungen zur Supplementierung schwangerer Frauen mit Vitamin A herausgegeben. Wie aus Tabelle 1.1 ersichtlich ist der Bereich zwischen empfohlener Gabe und Grenzwert sehr eng festgelegt. Ein oberer Grenzwert für die tägliche Vitamin-A-Supplementierung schwangerer Frauen ist in jedem Fall bei 10.000 IU Vitamin A zu setzen. Dieser obere Grenzwert wurde auch in der epidemiologischen Studie von Rothman et al. (Rothman et al. 1995) ermittelt und sollte zusätzlich für Frauen im gebärfähigen Alter angelegt werden, da die Gefahr einer fruchtschädigenden Wirkung vor allem in den ersten Schwangerschaftswochen besteht, in denen eine Schwangerschaft häufig noch nicht indiziert ist.



## *1 -Einleitung*

Organisation	Empfohlen	Grenzwert
Weltgesundheitsbehörde (WHO), 1988	2000 IU/Tag	< 10.000 IU/Tag
USA, 1989, Recommended Dietary Allowance	2700 IU/Tag	-
Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 1991	3700 IU/Tag	< 10.000 IU/Tag
EU, Scientific Committee for Food, 1992	2300 IU/Tag	-
Bundesgesundheitsamt (jetzt BgVV), 1988	-	< 8.300 IU/Tag

Tabelle 1.1: Empfehlungen zur Vitamin-A-Supplementierung schwangerer Frauen (Anonymus 1995)

Im Jahre 1990 wurden in Großbritannien Lebern von Schlachttieren auf ihren Vitamin-A-Gehalt untersucht. Es konnten Gehalte ermittelt werden, die deutlich über den in den einschlägigen Nährwerttabellen verzeichneten Werten lagen. Das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) strebte eigene Untersuchungen an und veröffentlichte einen Abschlußbericht zu diesen Untersuchungen (Anonymous 1995). Diesen Untersuchungen zufolge konnte eine durchschnittliche Lebermahlzeit durchaus die 10- bis 30-fache Menge des Grenzwertes für schwangere Frauen enthalten. In Abbildung 1.13 sind die minimalen, mittleren und maximalen Vitamin-A-Gehalte in der Leber verschiedener Tierspezies aufgeführt, die in Untersuchungen des BgVV ermittelt wurden. Es hat sich gezeigt, daß die Vitamin-A-Gehalte in Schlachtierlebern sehr großen Schwankungen unterlagen, die vermutlich auf unterschiedliche Haltungs- und Fütterungsbedingungen zurückzuführen waren. In der blauen Liste für Tierarzneimittel (Barsoi-Liste) werden zahlreiche hochdosierte Vitamin-A-Präparate aufgeführt, die zur Streßminderung und Krankheitsprophylaxe ohne besondere Vorschriften eingesetzt werden können. In Fütterungsversuchen an verschiedenen Tieren konnte zudem gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen der Vitamin-A-Aufnahme über das Futter und dem Vitamin-A-Gehalt in der Leber von Schlachttieren besteht (Landes 1994).

## 1 -Einleitung

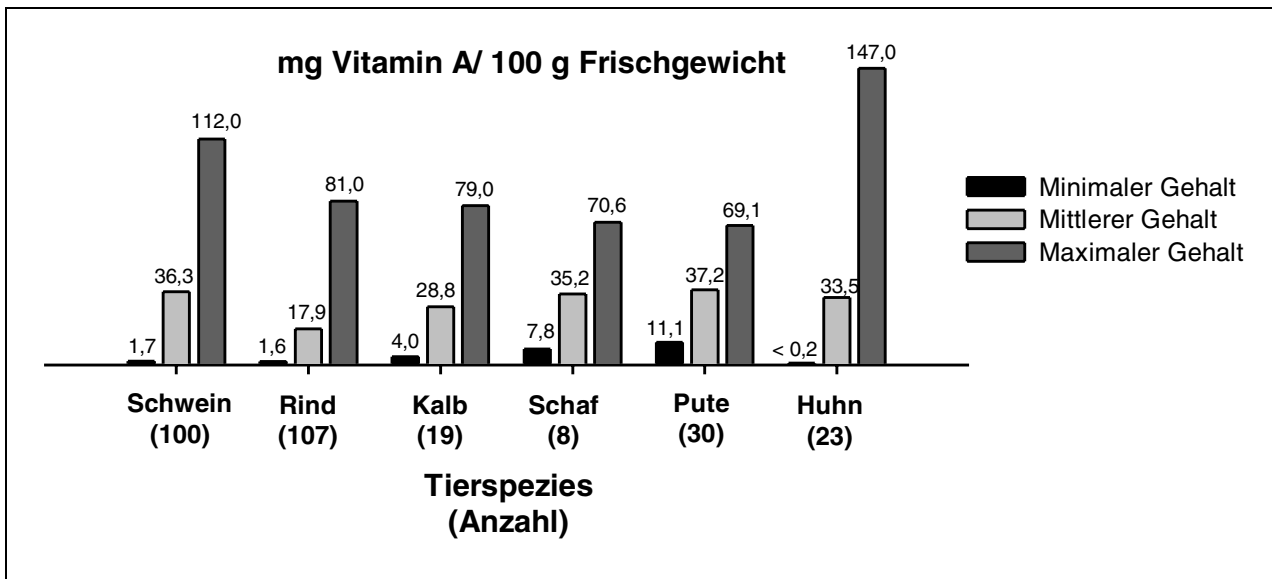


Abbildung 1.13: Minimaler, mittlerer und maximaler Vitamin-A-Gehalt in Lebern von Schlachttieren aus Deutschland.

Bisher gibt es erst eine Humanstudie, die sich mit der Risikoabschätzung einer erhöhten Vitamin-A-Aufnahme nach Leberverzehr bzw. Supplementation beschäftigte (Buss et al. 1994). Dabei wurde Probanden dieselbe Vitamin-A-Menge (50 mg bzw. 150 mg Retinol) in Form einer Lebermahlzeit oder als Nahrungsergänzung (öliges Supplement) verabreicht. Anschließend wurden Plasmaspiegel der verschiedenen Retinoid-Metaboliten über einen längeren Zeitraum gemessen und die Plasmakinetiken nach Leberverzehr bzw. Supplementation verglichen. Ein wesentlicher Unterschied war, daß gemessen an Plasma-AUC- und  $C_{\max}$ -Werten der oxidative Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA, 13-*cis*-RA und den 4-oxo-RA-Isomeren nach Supplementation wesentlich ausgeprägter war, obwohl die Plasmaspiegel der Vorläufersubstanzen (Retinylester und Retinol) nahezu vergleichbar waren. In Abbildung 1.14 sind die in dieser Studie ermittelten Plasma-AUC- und  $C_{\max}$ -Werte (n=10) der Vorläufersubstanz Retinylpalmitat und des oxidativen Metaboliten all-*trans*-RA nach Supplementation (S) und Leberverzehr (L) vergleichend gegenübergestellt. Es zeigte sich, daß die relative Bioverfügbarkeit von Vitamin A nach Leberverzehr (gemessen am AUC-Wert) im Vergleich zur Supplementation immerhin noch 75% betrug, wohingegen der oxidative Metabolismus im Verhältnis dazu deutlich verringert war. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß nach Vitamin-A-Supplementation durch Übersättigung der bekannten Absorptions- und Metabolismuswege eine vermehrte Oxidation stattfand. Ein möglicher Mechanismus könnte ein im Gastrointestinaltrakt stattfindender

Metabolismus überschüssigen Retinols zu all-*trans*-RA darstellen. Durch die verzögerte, aber nur wenig verringerte Absorption von in der Lebermahlzeit vorhandenem Vitamin A wäre ein solcher Schritt nach Leberverzehr nicht zu erwarten.

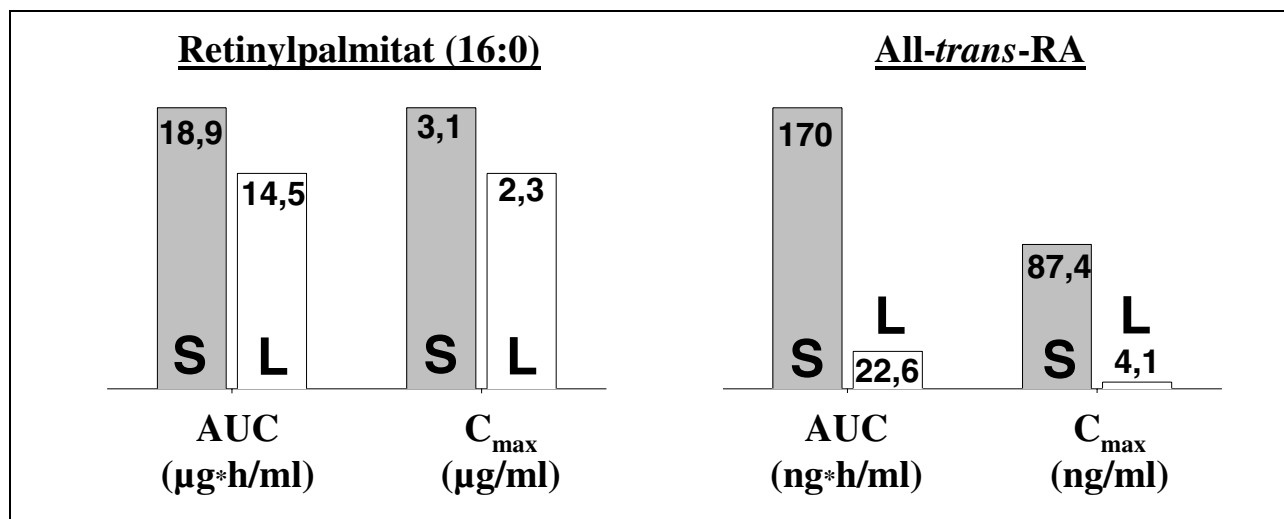


Abbildung 1.14: AUC- und C<sub>max</sub>-Werte (n=10) der Vorläufersubstanz Retinylpalmitat sowie des oxidativen Metaboliten all-*trans*-RA in Humanplasma nach Gabe von 150 mg Vitamin A als Supplement (S) oder Leber (L) (Buss et al. 1994).

Da die Aufnahme solch hoher Vitamin-A-Dosen über eine Supplementation nur bei mißbräuchlicher Anwendung zu erwarten ist, kann ein Vergleich gleich hoher Vitamin-A-Dosen nach Supplementation und Leberverzehr nicht zu einer rationalen Risikoabschätzung einer teratogenen Wirkung von Vitamin A nach Leberverzehr beitragen. Ein Vergleich der Plasmaspiegel von Retinoid-Metaboliten nach chronischer Supplementation mit einer üblichen Tagesdosis und nach Leberverzehr wäre in diesem Fall sinnvoller gewesen.

### 1.11 Phytol als Vorläufersubstanz von Phytansäure

Phytol ist ein Bestandteil des ubiquitär vorkommenden Chlorophyllmoleküls und eine Vorläufersubstanz für Phytansäure in Säugetieren. Beim Menschen stiegen nach Aufnahme hoher Dosen freien Phytols die Phytansäure-Plasmaspiegel bis zu zehnfach an (Avigan 1966). Nach Verzehr einer großen Portion gekochten Spinats konnte hingegen kein solch bedeutender Anstieg der Plasmaspiegel beobachtet werden (Avigan 1966). Dieser Unterschied wurde damit erklärt, daß oral verabreichtes freies Phytol vom Menschen sehr effizient über die Lymphe aufgenommen

## 1 -Einleitung

---

wird (61-94 % der verabreichten Dosis), wohingegen in Chlorophyll eingebundenes Phytol größtenteils wieder ausgeschieden wird (Steinberg 1995). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, daß Phytol *in vivo* zu Phytansäure metabolisiert wurde, so daß dieser Metabolit nach Verabreichung von Phytol im Organismus akkumulierte (Steinberg et al. 1965, 1966a, 1966b). Phytansäure selbst wird außerdem im Fettgewebe von Wiederkäuern angereichert und kann durch den Verzehr von tierischem Schmalz oder von Milchprodukten aufgenommen werden. Eine durchschnittliche Mahlzeit kann bis zu 50-100 mg Phytansäure enthalten (Steinberg 1995).

Die Aufklärung der Biosynthese und des Abbauweges von Phytansäure hat an Bedeutung gewonnen, nachdem gezeigt werden konnte, daß Phytansäure ein natürlicher Ligand für einen der Retinoid-Rezeptoren (RXR $\alpha$ ) ist. Phytansäure zeigte sich in der Lage, RXR-responsive Promotoren zu aktivieren und eine Änderung der Konformation des RXR $\alpha$ -Proteins ähnlich der durch 9-*cis*-RA induzierten Änderung zu erzielen (LeMotte et al. 1996). Damit ergaben sich erste Hinweise darauf, daß die Signalwege von Retinoiden und von Phytansäure Gemeinsamkeiten haben (s. Abschnitt 1.9.1).

*In vitro*-Studien mit postnukleären und subzellulären Fraktionen aus Rattenlebern haben gezeigt, daß die Biokonversion von Phytol zu Phytansäure in mitochondrialen und mikrosomalen, aber nicht in cytosolischen Fraktionen stattfindet (Muralidharan and Muralidharan 1986; Muralidharan and Muralidharan 1985). Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Phytansäure aus Phytol über das Zwischenprodukt Phytensäure läuft (s. Abbildung 1.15). Als weiteres, eher spekulatives Zwischenprodukt wurde Dihydrophytol in Betracht gezogen. Die Oxidation von Phytol wurde *in vivo* in tierexperimentellen Studien (Mize et al. 1966; Steinberg et al. 1966), in gesunden Menschen, aber auch in Patienten mit Refsum-Syndrom untersucht (Steinberg et al. 1965). Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Störung der Phytansäure- $\alpha$ -Oxidation, die durch die Akkumulation von Phytansäure in Lipidfraktionen der Leber, der Niere und der Muskeln sowie im Urin charakterisiert ist. Interessanterweise manifestierten sich bei Refsum-Patienten einige klinische Erscheinungen, die mit den nach Vitamin-A-Defizienz oder -Überschuß auftretenden Krankheitsbildern übereinstimmten, z.B. Ichthyose und Retinitis pigmentosa (Stuttgen 1986; van Soest et al. 1999; Kaufman 1998).

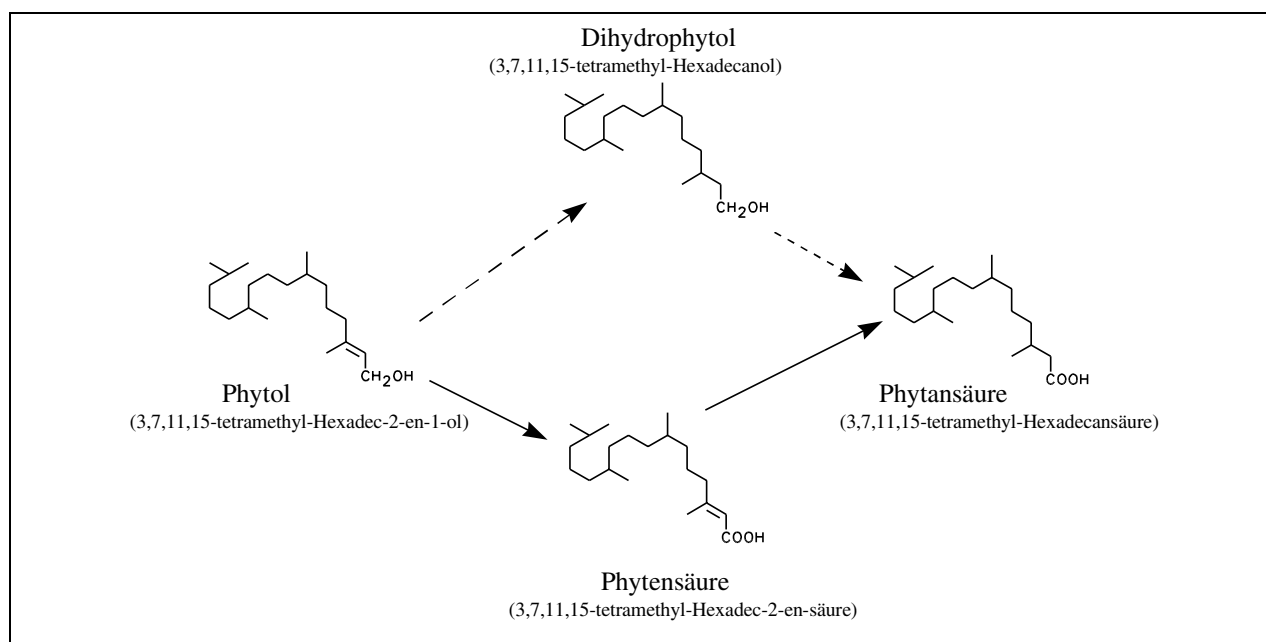


Abbildung 1.15: Biosynthesewege zur Bildung von Phytansäure aus Phytol<sup>1</sup>.

Da Phytansäure aufgrund seiner Methylgruppe in  $\beta$ -Stellung einer für Fettsäuren üblichen  $\beta$ -Oxidation nicht zugänglich ist, muß zunächst eine zweistufige  $\alpha$ -Oxidation zur Pristansäure vollzogen werden, bevor ein Abbau der Fettsäure durch  $\beta$ -Oxidation stattfinden kann (s. Abbildung 1.16). Der Mechanismus und die subzelluläre Lokalisation der Phytansäure- $\alpha$ -Oxidation werden schon sehr lange debattiert, sind aber noch nicht vollständig geklärt. Viele Arbeiten deuten darauf hin, daß dieser Prozeß in den Peroxisomen stattfindet (Jansen et al. 1996; Wanders et al. 1994; Singh et al. 1993; Pahan and Singh 1993). Ein weiteres Indiz dafür ist, daß Phytansäure auch beim Zellweger-Syndrom, einer autosomal-rezessiv vererbten Fehlbildung von Peroxisomen in Leber und Nieren, vermehrt im Blut der Patienten angereichert und in erhöhten Mengen renal ausgeschieden wurde.

Dennoch sind Stoffwechsel-Aktivitäten auch in mikrosomalen Fraktionen aus humaner Leber von Zellweger-Patienten und gesunden Probanden gefunden worden (Verhoeven et al. 1997). In mitochondrialen Fraktionen aus Rattenlebern war die  $\alpha$ -Oxidation von Phytansäure durch

<sup>1</sup> Da Phytansäure als RXR-Ligand beschrieben wurde, erfolgte die Darstellung der Strukturformeln in der rotameren, strukturähnlichen Form des RXR-Liganden 9-*cis*-RA. Eine Darstellung in durchgestreckter Form wäre ebenso möglich gewesen.

## 1 -Einleitung

Cytochrom P450-Inhibitoren wie Ketoconazol (Pahan et al. 1994) bzw. durch Kohlenmonoxid (Muralidharan and Kishimoto 1984) hemmbar.

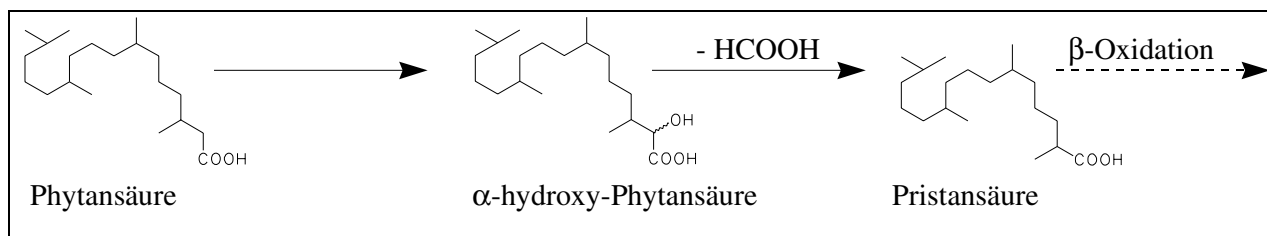


Abbildung 1.16: Abbau von Phytansäure durch  $\alpha$ -Oxidation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Cytochrom P450<sub>BM-3</sub>, ein prokariotisches P450-Enzym von *Bacillus megaterium* ATCC 14581, das der Cytochrom P450-Familie 4A in der Sequenz sehr ähnelt, eine  $\omega$ -Hydroxylierung von Phytansäure durchführt und sogar durch Phytansäure induzierbar ist (English et al. 1997). Eine Beteiligung von P450-abhängigen Metabolismus-Schritten bei dem Abbau von Phytansäure erscheint also möglich.

### 1.12 Analytik von Retinoiden

Das breite Spektrum der Substanzen in dieser Klasse von Verbindungen, ihre relative Instabilität gegenüber Isomerisierungen und Oxidationsprozessen und die geringen Konzentrationen, in denen Retinoide in biologischen Proben vorkommen, stellen spezielle Probleme im Hinblick auf ihre Analytik dar. Eine Probenvorbereitung biologischer Matrices sollte möglichst kurz sein und ohne Einfluß von Licht, Sauerstoff oder Hitze erfolgen.

Die analytische Bestimmung an sich wurde bisher in der Regel mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion durchgeführt (Wyss 1995). Die UV-Detektion erwies sich aufgrund der starken Absorption der Retinoide bei relativ spezifischen Wellenlängen (310-370 nm) als sehr sensitiv. Der Einsatz von Mehrwellenlängen-Detektoren hat sich im Bereich der Retinoid-Analytik bewährt, da durch Berechnung des Flächenverhältnisses bei zwei verschiedenen Wellenlängen mögliche Verunreinigungen erkannt werden konnten (Eckhoff and Nau 1990). Photodiodenarray-Detektoren haben an Bedeutung gewonnen, da der bisher bestehende Nachteil der geringeren Sensitivität gegenüber UV-Detektoren behoben ist. In wenigen Spezialfällen fanden auch Fluoreszenz-Detektoren (MacCrehan and Schonberger 1987;

Epler et al. 1993) in der Retinoid-Analytik ihren Einsatz. In letzter Zeit wurden HPLC-Methoden für die Retinoid-Analytik auch in Kombination mit elektrochemischen Detektoren erarbeitet (Sakhi et al. 1998).

Die Entdeckung neuer Stoffwechselwege und die Identifizierung bisher unbekannter Metabolite führte zu einer Vielfalt aufzutrennender Substanzen, so daß die HPLC-UV-Analytik bereits an ihre Grenzen stieß. Polare und unpolare Retinoid-Metabolite (4-oxo-RA-, 4-hydroxy-RA-, RAG- und RA-Isomere sowie Retinol und Retinylester) in einem HPLC-Lauf ohne Interferenzen zu chromatographieren, ist kaum möglich. Die Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie-Techniken (LC-MS) eröffnet hier neue Möglichkeiten, da mögliche Interferenzen mit einer anderen als der zu detektierenden Masse „einfach“ ausgeblendet werden können. In der Vergangenheit sind bereits verschiedene LC-MS-Verfahren zur Retinoid-Analytik beschrieben worden (Eckhoff et al. 1990; Salyers et al. 1993; Ranald et al. 1993). Diese waren jedoch auf RA-Metabolite beschränkt und benötigten zumeist einen Derivatisierungsschritt, um die Flüchtigkeit der Retinsäure z.B. für die Thermospray-MS zu erhöhen. Eckhoff et al. (1990) gelangen die Identifizierung und Charakterisierung oxidierter und glukuronidierter Metaboliten von Retinol in Affenplasma mittels Thermospray-MS ohne vorherige Derivatisierung. Die Bestimmung von Retinol, Retinal und all-*trans*-RA mittels Elektrospray-MS ist ebenfalls beschrieben (Van-Breemen and Huang 1996). Allerdings konnten diese Komponenten nicht unter den gleichen Elektrospray-Bedingungen ionisiert werden, so daß eine Kombination aus positivem und negativem Ionen-Elektrospray angewendet werden mußte. Die Bestimmung von 13-*cis*-RA und all-*trans*-RA in Humanplasma mittels HPLC und *particle beam*-MS nach Derivatisierung zu Pentafluorobenzylestern ist ebenfalls durchgeführt worden (Lehman and Franz 1996). Nach negativer chemischer Ionisierung mittels Methan wurde das Carboxylat-Anion bei  $m/z$  299 detektiert. Eine wesentliche Verbesserung stellte die Entwicklung einer LC-MS-Methode zur Trennung und Quantifizierung von Retinol und Retinylestern dar, die sich der chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization, APCI*) bediente. Sowohl bei Retinol als auch bei den Estern war das Fragmention  $m/z$  269 der Basispeak und wurde zur Quantifizierung herangezogen (van-Breemen et al. 1998).





### **2 Ziel der Arbeit**

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zum Vitamin-A-Gehalt in Schlachttierlebern geben Anlaß zu dem Verdacht, daß bei Schwangeren sowie Frauen im gebärfähigen Alter nach Verzehr einer Lebermahlzeit das Risiko einer teratogenen Wirkung von Vitamin A insbesondere in der Frühschwangerschaft nicht auszuschließen ist. Eine Humanstudie, in der der Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr bzw. Supplementation untersucht wurde, hat die Plasmakinetik von Retinoiden nach Gabe äquivalenter Vitamin-A-Mengen (50 mg oder 150 mg Vitamin A) verglichen (Buss et al. 1994). Da solch hohe Mengen als Supplement normalerweise nicht verabreicht werden, erscheint es angebracht, den Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr bzw. nach chronischer Supplementation geringer Vitamin-A-Mengen zu vergleichen. Bisher sind - u.a. auch in unserer Arbeitsgruppe - zahlreiche Suppletionsstudien durchgeführt worden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit dazu beigetragen werden, neue Erkenntnisse über den Metabolismus und das damit verbundene Gefahrenpotential einer Vitamin-A-Aufnahme nach Leberverzehr zu gewinnen. In einem weiteren Versuch sollten die Retinoid-Plasma-Profile zum Zeitpunkt der maximalen Konzentrationen der Retinsäuren nach Gabe von Vitamin A als Supplement (Zeitpunkt 2 h) oder als Lebermahlzeit (Zeitpunkt 4 h) verglichen werden. Um eine rationale Risikoabschätzung durchführen zu können, sollten die Ergebnisse dieser Studie mit anderen Humanstudien, aber auch mit tierexperimentellen Untersuchungen verglichen werden. Letztere erlauben die quantitative Bestimmung von Retinoiden nicht nur in maternalem Plasma, sondern auch im Zielgewebe Embryo, so daß Rückschlüsse auf die teratogene Aktivität eines Retinoids und seine Schwellenkonzentration zur Auslösung embryotoxischer Effekte gezogen werden können.

Die Studie von Buss et al. (Buss et al. 1994) offenbarte einen weiteren Aspekt, der im Hinblick auf den Metabolismus von Vitamin A nach Supplementation oder Leberverzehr Fragen aufwarf. Nach Supplementation unphysiologisch hoher Vitamin-A-Mengen konnten im Plasma extrem hohe Konzentrationen an *all-trans*-RA gemessen werden, nach Gabe von Vitamin A als Lebermahlzeit jedoch nicht. In beiden Fällen waren die Plasma-Konzentrationen der Retinylester, die die Vorläufersubstanzen für die oxidativen Retinoid-Metaboliten darstellen, (gemessen am AUC-Wert) vergleichbar hoch, so daß eine verringerte Resorption von Vitamin A aus der Lebermahlzeit als Grund für den Unterschied nicht in Frage kam. Da das Auftreten der  $C_{\max}$ -

## 2 - Ziel der Arbeit

---

Werte von all-*trans*-RA im Plasma zeitlich noch vor dem der Retinylester lag, war zu vermuten, daß der Metabolismus nicht ausschließlich in der Leber stattfand. Es wurde angenommen, daß der Intestinaltrakt nicht nur an Absorption und Weitertransport von Vitamin A beteiligt ist, sondern bei hohen Vitamin-A-Mengen Retinol auch oxidativ metabolisiert, die erzeugten Metaboliten dann über die Portalvene in die systemische Zirkulation abgibt und somit zu den extrem hohen Plasmakonzentrationen an Retinsäuren beiträgt. Um diesen Sachverhalt zu klären, sollten *in vitro*- und *in vivo*-Experimente zu einem möglichen intestinalen Metabolismus durchgeführt werden.

Phytansäure, ein Metabolit des Chorophyll-Bestandteils Phytol, wurde als Ligand für die Retinoid X Rezeptoren (RXR) beschrieben (LeMotte et al. 1996). Die RXR zählen zu den nukleären, Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren und beeinflussen als Heterodimer-Partner u.a. für die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) die Expression bestimmter Gene. Die teratogene Wirkung von Vitamin A wird - wenn auch nicht ausschließlich - durch den Metabolismus zu aktiven Retinsäuren (vor allem all-*trans*-RA) erklärt, die dann an RAR binden und dadurch Einfluß auf die Expression von Genen während der Embryonalentwicklung nehmen. Tierexperimentelle Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, daß die embryotoxischen Wirkungen synthetischer RAR-Liganden durch die gleichzeitige Gabe eines RXR-Liganden potenziert werden können, auch wenn die alleinige Gabe des RXR-Liganden keinerlei embryotoxische Effekte auslöste. Um mögliche Synergismen zwischen natürlichen Lebensmittel-bestandteilen aufzudecken, sollte nun untersucht werden, ob auch die durch Gabe schwach teratogener Dosen der natürlichen Retinoide all-*trans*-RA oder Retinol auftretenden Mißbildungen durch gleichzeitige Gabe von Phytansäure oder deren Vorläufersubstanz Phytol potenziert werden können.

Die quantitative Bestimmung von Retinoiden erfolgte bisher mittels HPLC und UV-Detektion bei zwei Wellenlängen nach vorgeschalteter Festphasenextraktion. Besonders bei der Messung im ppb-Bereich vorkommender, endogener Retinoide stößt diese Methode an ihre Grenzen, da Verunreinigungen nur schwer zu erkennen sind und dadurch die Gefahr besteht, Retinoid-Konzentrationen zu hoch einzuschätzen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einsatz eines neuartigen HPLC-Systems getestet werden, das mit einem Diodenarray-Detektor und einer massenspektrometrischen Detektionseinheit mit mehrmaligen Fragmentierungsmöglichkeiten (MS<sup>n</sup>-Technik) ausgestattet ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

##### 3.1.1 Retinoide

Retinoide sind sehr empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff und Wärme. Um die durch Einfluß der genannten Parameter auftretenden Reaktionen (Isomerisierung und Zersetzung) zu vermeiden, wurde mit Standardsubstanzen ebenso wie mit Proben nur in abgedunkelten Räumen und unter Gelblicht gearbeitet (Landers und Olson 1986). Desweiteren wurden Retinoid-Standardlösungen bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt, Proben unverzüglich bei -80°C oder -20°C gelagert. Als Feststoffe wurden Retinoide bei -20°C oder +4°C unter Argon oder Stickstoff aufbewahrt. Der Großteil der Retinoide, die in den hier vorgestellten Untersuchungen als Referenzsubstanzen dienten oder für Versuche eingesetzt wurden, war ein Geschenk von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz). 9,13-di-*cis*-RA wurde von Hoffmann-La Roche in Nutley (NJ, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Retinylester (außer Retinylpalmitat) wurden in unserem Labor synthetisiert (s. 3.5). Die Glukuronide der all-*trans*-Retinsäure (all-*trans*-RAG) und des all-*trans*-Retinols (all-*trans*-ROG) wurden von Dr. J.A. Olson und Dr. A.B. Barua aus Ames (IA, USA) bereitgestellt oder in unserem Labor von Herrn Ralph Rühl synthetisiert.

Standardsubstanz	Reinheit	bezogen bei	Bestell-Nr.
All- <i>trans</i> -Retinol	≥99%	Fluka	95144
13- <i>cis</i> -Retinol	85%	Sigma	R6132
All- <i>trans</i> -Retinylpalmitat	-	Sigma	R1512
All- <i>trans</i> -Retinsäure	-	Sigma	R2625
13- <i>cis</i> -Retinsäure	-	Sigma	R3255
9- <i>cis</i> -Retinsäure	98%	Sigma	R4643
All- <i>trans</i> -Retinal	-	Sigma	R2500

Tabelle 3.1: Kommerziell erhältliche, verwendete Retinoide.

### 3 - Material und Methoden

14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR), Anhydroretinol (AR), 4-oxo-Retinol und 4-hydroxy-Retinol waren ein Geschenk von Dr. F. Derguini und Dr. J. Buck (New York, NY, USA). Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Retinoide waren als Standardsubstanzen kommerziell erhältlich.

Retinoid	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (1000 cm <sup>2</sup> / mol)
All- <i>trans</i> -Retinol	325	52.770
All- <i>trans</i> -Retinylpalmitat	325	49.260
13- <i>cis</i> -Retinylpalmitat	328	48.305
9- <i>cis</i> -Retinylpalmitat	323	42.300
9,13-di- <i>cis</i> -Retinylpalmitat	324	39.500
All- <i>trans</i> -RA	350	45.300
13- <i>cis</i> -RA	354	39.750
9- <i>cis</i> -RA	345	36.900
9,13-di- <i>cis</i> -RA	346	34.500
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	360	58.220
All- <i>trans</i> -4-hydroxy-RA <sup>1</sup>	347	19.500
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	361	39.000
13- <i>cis</i> -4-hydroxy-RA <sup>1</sup>	344	45.000
All- <i>trans</i> -RAG	360	50.700
All- <i>trans</i> -ROG	325	44.950
All- <i>trans</i> -3,4-didehydro-Retinol	350	41.320
All- <i>trans</i> -3,4-didehydro-RA	370	41.570
14-HRR <sup>2</sup>	348	53.960
Anhydroretinol <sup>2</sup>	371	97.820

Tabelle 3.2: Maximale Absorptionswellenlängen ( $\lambda_{\max}$ ) und Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der verwendeten Retinoide (gelöst in Ethanol).

<sup>1</sup> Mitteilung von Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

<sup>2</sup> Persönliche Mitteilung von Dr. F. Derguini

### 3 - Material und Methoden

---

Stammlösungen der Retinoide wurden in der Regel zunächst in einer Konzentration von 0,1 mg/ml (all-*trans*-Retinol und Retinylpalmitat 1 mg/ml) eingewogen und in Ethanol hergestellt. Die genaue Konzentration wurde dann photometrisch ermittelt und unter Verwendung des spezifischen, molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) bei der maximalen Wellenlänge ( $\lambda_{\max}$ ) berechnet. Die Werte wurden der Literatur entnommen (Furr et al. 1994). Die photometrischen Messungen erfolgten unter Verwendung eines Shimadzu UV-160 Photometers (Shimadzu, Kyoto, Japan) oder eines UV-VIS Spektrometer Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Überlingen, D). Die Umrechnung der erhaltenen Extinktionswerte in Konzentrationen erfolgte gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz nach folgender Formel:

$$c \text{ [g/l]} = (E \bullet V \bullet M) / (\epsilon \bullet d)$$

(E = ermittelte Extinktion, V = Verdünnungsfaktor, M = Molmasse (g/mol),  $\epsilon$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient (1000 cm<sup>2</sup>/mol), d = Schichtdicke der Küvette in cm).

#### 3.1.2 Chemikalien und Chromatographie-Material

Lösungsmittel für die HPLC wurden in „HPLC gradient grade“-Qualität entweder von Merck (Darmstadt, D) oder von Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Gleiches galt für die Lösungsmittel, die zur Extraktion oder zum Ansetzen von Standards verwendet wurden (Ethanol, Isopropanol, Dimethylsulfoxid, Aceton). Toluol, Dioxan (HPLC-Qualität) und Cyclohexanol (p.a.) zum Herstellen von HPLC-Säulen wurden von Fluka (Deisenhofen, D) erhalten. Hochreines Wasser wurde einem Milli-Q plus Wasserreinigungs-System entnommen (Millipore, Eschborn, D).

Das für die *reversed phase*-Chromatographie verwendete Material bestand aus Spherisorb ODS 2 und wurde von Waters (Milford, MA, USA) als loses Material bezogen. Es handelte sich um Octadecylsilica-Material (endcapped; sphärische Partikel; 3  $\mu$ m). Dieses Material wurde zum Selbstpacken der HPLC-Säulen verwendet. Vertex-Leersäulen (120 x 4 mm oder 60 x 4 mm) wurden hierzu von Fa. Knauer (Berlin, D) bezogen. Unter Anwendung einer Suspensions-Methode (Meyer 1992) wurden ca. 1,3 g Chromatographie-Material (für 120 x 4 mm Säulen) eingewogen, in 15 ml Toluol/Dioxan (1:1; v/v) und 19 ml Cyclohexanol verteilt und durch Ultraschallbehandlung in eine stabile Suspension (*slurry*) verwandelt. Die Mischung wurde in ein

Reservoir (Säulenpackvorrichtung, Knauer) gegeben, an dessen Ende eine Leersäule montiert war. Diese Leersäule war am Auslaß mit Filtern und Sieben verschlossen. Die Suspension wurde mit Hilfe einer pneumatischen Pumpe (Knauer), die Methanol förderte, mit Hochdruck (500 bar) durch die Säule gepresst. Nachdem ca. 300 ml Methanol durchgeflossen waren, wurde der Druck heruntergeregelt und die Säule abmontiert. Überschüssiges Chromatographie-Material wurde vorsichtig weggekratzt, bevor die Säule am Kopf mit Sieben und Filtern versehen wurde. Die Trennleistung der Säule wurde durch isokratische Analyse einer Standardmischung aus 5 Benzoessäureestern mit Methanol/Wasser (75:25; v/v) als mobile Phase und UV-Detektion bei 250 nm getestet. Die Anzahl der theoretischen Böden der mit dieser Technik gepackten Säulen lag in der Regel bei 90.000-100.000/m.

#### **3.1.3 Sonstiges**

Cremophor EL, Phytansäure, Phytol sowie Fettsäurechloride zur Herstellung von Retinylestern wurden bei Firma Sigma (Deisenhofen, D) bezogen. Da Linolsäure- sowie Linolensäurechlorid käuflich nicht zu erwerben war, wurde es aus den entsprechenden Fettsäuren (bezogen von Sigma) und Thionylchlorid synthetisiert (s. 3.5). Sämtliche anorganischen Salze sowie Chemikalien zur Fixierung, Färbung und Lagerung von Embryonen (Formaldehyd, Alizarinnatriumsulfat, Glycerin) wurden von Merck (Darmstadt, D) bezogen. 1,4-Dithiothreitol wurde von Pharmacia (Freiburg, D) erhalten.  $\beta$ -Glukuronidase aus *E. coli* (EC 3.2.1.31; 200 IU/ml) wurde von Boehringer Mannheim (D) erworben, Cholesterylesterase aus Rinderpankreas (EC 3.1.1.13, 20 IU/ml) von Sigma. Das Methylierungsreagenz Diazomethan wurde aus 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitroso-Guanidin mit einem kommerziell erhältlichen Kit hergestellt (Aldrich, Steinheim, D). Hochgereinigtes Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) wurde von Sigma bezogen. Eine 5%ige Lösung wurde in Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline; PBS) hergestellt und als Matrix für Standardlösungen verwendet. PBS hatte die folgende Zusammensetzung: NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,15 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 g/l),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 g/l).

## **3.2 Probanden für Humanstudien und Versuchstiere**

### **3.2.1 Menschliche Probanden**

#### 3.2.1.1 Studie zum Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr

Für diese Studie wurden zehn gesunde, männliche Probanden herangezogen. Die Probanden hatten ein Alter von  $26,1 \pm 2,6$  Jahren, ein Körpergewicht von  $82,0 \pm 12,8$  kg und eine Körpergröße von  $185,4 \pm 5,2$  cm. Der Gesundheitsstatus wurde in erster Linie durch ärztliche Befragung der Patienten festgestellt. Weiterhin wurden klinisch-chemische Parameter in den Plasmaproben bestimmt (s. Tabelle I im Anhang). Diese Parameter beinhalteten ein Blutbild mit Differentialblutbild, Plasma-Enzymaktivitäten (GOT<sup>1</sup>, GPT, AP, GGT) sowie Werte für Hämoglobin, Hämatokrit, Plasma-Kreatinin und Plasma-Harnstoff. Die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter erfolgte unter Leitung von Prof. Dr. med. H.-J. Dulce am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie des Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin. Alle gemessenen Parameter befanden sich innerhalb des Normbereiches für Gesunde. Zwei Teilnehmer der Studie waren Raucher, keiner der Probanden nahm Medikamente zu sich oder wies einen Verdacht auf Alkoholabusus auf. Allen Teilnehmern wurde eine Zusammenfassung über Zweck und Ablauf der Studie übergeben. Die Probanden gaben eine schriftliche Teilnahme-Einwilligung ab.

#### 3.2.1.2 Studie zum Vergleich Supplement - Leberverzehr

Die Durchführung dieser Studie erfolgte in der Clinical Pharmacology Group der University of Southampton (GB) unter der Leitung von Prof. A.G. Renwick. Für die Studie wurden 9 weibliche Probanden mittleren Alters herangezogen.

### **3.2.2 Versuchstiere**

#### 3.2.2.1 Schwein

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Tier wurde vom Zentrum für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. H.J. Rothkötter) zur Verfügung gestellt (Genehmigung des Tierversuchs gemäß Az. 509i-42502-94/719; Bezirksregierung Hannover). Es handelte sich um ein 14 Wochen altes Schwein (Deutsche Landrasse, 23,0 kg Körpergewicht),

---

<sup>1</sup> Die Terminologie der Parameter ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

### 3 - Material und Methoden

---

das im dortigen Zentralen Tierlaboratorium in einer mit Streu gefüllten Holzbox unter Tageslichtbedingungen gehalten wurde. Das Tier wurde *ad libitum* mit Wasser und Alleinfutter für Sauen (Kompromissfutter, RHG Nord AG, Hannover) versorgt.

#### 3.2.2.2 Mäuse

Für die unter 3.3.4 beschriebenen Versuche wurden weibliche Mäuse (NMRI, Harlan-Winkelmann, Borcheln, D) mit einem Gewicht von 29-35 g verwendet (Genehmigung der Tierversuche gemäß Az. 97-957; Bezirksregierung Hannover). Für die Kinetik- und Teratogenitäts-Untersuchungen wurden diese Mäuse zwischen 6<sup>00</sup> und 9<sup>00</sup> Uhr verpaart. Eine Konzeption wurde angenommen, wenn nach der Verpaarung ein Vaginalpfropf festgestellt wurde. Die ersten 24 Stunden der Schwangerschaft galten als Tag 0 der Tragzeit (Gestationstag 0, GD 0). Die Tiere wurden *ad libitum* mit Nagetier-Futter (Altromin 1324, Altromin, Lage, D) sowie Wasser versorgt und unter kontrollierten Bedingungen bei Raumtemperatur ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), relativer Luftfeuchtigkeit ( $55 \pm 5\%$ ) und 12-Stunden dauerndem Hell-Dunkel-Zyklus (mit Licht zwischen 10<sup>00</sup> und 22<sup>00</sup> Uhr) gehalten.

### **3.3 Humanstudien**

#### **3.3.1 Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr**

Diese Studie wurde durchgeführt, um ein mögliches Risiko teratogener Effekte nach exzessiver, oraler Vitamin-A-Aufnahme durch den Verzehr von Leber im Vergleich zu Supplementationsstudien abschätzen zu können. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die in verschiedenen Tierspezies bereits identifizierten, neuen Retinoid-Metaboliten auch im menschlichen Plasma nach Leberverzehr auftraten. Dazu wurde den Probanden dieser Studie eine Mahlzeit aus Putenleber und Beilagen verabreicht. Die Putenlebern stammten von einer lokalen Schlachtereier, die ihre Ware aus Freilandhaltungs-Betrieben bezog. Am Abend vor der Studie wurden Leberportionen von 2 g Rohgewicht/kg Körpergewicht (KG) der Probanden abgewogen. Drei bis vier Lebern ergaben dabei eine Mahlzeit. Die Portionen wurden getrennt voneinander in Sonnenblumenöl gebraten (2 min Bratzeit pro Seite). Ein zufällig ausgewähltes, schmales Stück jeder rohen und anschließend gebratenen Leber wurde abgeschnitten und diente der späteren Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes. Anschließend wurden Mahlzeiten für jeden Probanden



präpariert, die die gebratenen Lebern sowie Kartoffelbrei und Apfel-Zwiebel-Gemüse beinhalteten. Am Morgen der Studie wurden diese Mahlzeiten für 5 min in einem Mikrowellen-Gerät erwärmt.

Die Probanden dieser Studie (s. 3.2.1) wurden am Morgen direkt vor Verabreichung der Mahlzeit an den Studienort bestellt. Blutproben wurden durch Venenpunktion in heparinisierten 10 ml-Vacutainer-Gefäßen (Beckton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) gesammelt und sofort dunkel und auf Eis gelagert. Nach Sammlung einer 0 h-Probe erhielten die Probanden ihre Mahlzeit. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 24 h nach Beendigung der Mahlzeit wurden zusätzliche Blutproben gesammelt. Die Probanden erhielten eine Vitamin-A-arme Mahlzeit (Pizza) nach Entnahme der 4h-Probe. Während der gesamten Studie stand es den Probanden frei, Orangensaft, Wasser, Tee oder entcoffinierten Kaffee zu trinken und fettarme Getreidesnacks zu verzehren. Den Probanden wurde erlaubt, nach Entnahme der 12 h-Probe den Studienort zu verlassen. Die 24 h-Probe wurde am Morgen des folgenden Tages gesammelt.

Die gesammelten Blutproben wurden so schnell wie möglich für 10 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert, das gewonnene Plasma wurde in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

#### **3.3.2 Vergleich Supplement - Leberverzehr**

Diese Studie hatte zum Ziel, den Metabolismus hoher Mengen Vitamin A zu aktiven Retinsäuren nach Verzehr von Leber bzw. Einnahme eines Vitamin-A-Supplements vergleichen zu können. Dazu wurden neun weiblichen Probanden folgende Vitamin-A-Dosen in zufälliger Reihenfolge in einem Abstand von 4 Wochen verabreicht:

- 50 mg Vitamin A in Form einer Mahlzeit aus Kalbsleber
- 50 mg Vitamin A in Form eines öligen Supplements (Arovit®, Hoffmann La Roche)
- 15 mg Vitamin A in Form eines öligen Supplements (Arovit®)

Vor der Gabe wurde den Probanden Blut abgenommen, um endogene Retinoid-Konzentrationen bestimmen zu können. Bei Verabreichung der Supplemente wurde nach 2 h erneut Blut abgenommen, bei der Lebermahlzeit nach 4 h. Daraus gewonnenes Serum wurde auf Retinoide analysiert.

#### 3.4 Intestinaler Metabolismus und Transport von Vitamin A

##### 3.4.1 *In vitro*-Metabolismus

###### 3.4.1.1 Gewinnung subzellulärer Fraktionen

Von einem am Schlachthof bezogenen Schweinedarm wurden zwei Drittel des proximalen Dünndarms beginnend ca. 20 cm hinter dem Pylorus abgetrennt. Aus diesem Abschnitt wurden die Epithelzellen (Enterozyten) herausgelöst. Die Isolierung erfolgte durch die Chelations-Elutions-Methode nach dem für die Isolierung von Rattenenterozyten beschriebenen Verfahren (Pinkus 1981). Die Bindung der Enterozyten an die Basalmembran wurde dabei durch Komplexierung mit EDTA (Di-Natriumsalz) gelockert, die Zellen wurden dann durch wiederholte Dehnung und Kontraktion der Darmwand freigesetzt und herausgespült.

Die isolierten Enterozyten wurden anschließend 5 min bei 2.300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde gesammelt und in einem Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert, der Kaliumchlorid (0,1 mol/l), EDTA (1 mmol/l), und Dithiothreitol (1 mmol/l) enthielt. Unter Verwendung eines Potter-Elvehjem-Teflon-Homogenisierers und eines Ultraschallfingers wurde die Suspension homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 10.000 g zentrifugiert, das Sediment anschließend verworfen. Der Überstand wurde dann 60 min bei 100.000 g zentrifugiert (Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotoren Typ 647.5 bzw. 65, Beckman, D). Der Überstand (= cytosolische Fraktion) wurde gesammelt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Das Sediment dieses Zentrifugationsschrittes wurde in dem Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert und nochmals ultrazentrifugiert (70 min, 100.000 g). Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Sediment in einem Phosphatpuffer (pH 7,4), der 20% Glycerin (w/v) und EDTA (1 mmol/l) enthielt, resuspendiert und bei -80°C eingefroren werden.

###### 3.4.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in cytosolischer und mikrosomaler Fraktion erfolgte mit Kupfer-(II)-sulfatlösung und Bicinchoninsäure (2,2'-Bicinchonyl-4,4'-dicarbonsäure) (Smith et al. 1985). Das Prinzip beruht darauf, daß bestimmte Aminosäurereste (Cystein, Tyrosin, Tryptophan) durch zweiwertiges Kupfer oxidiert werden können. Bicinchoninsäure bildet mit dem dabei entstehenden einwertigem Kupfer einen intensiv violetten Komplex, der photometrisch bestimmt werden kann.

### 3 - Material und Methoden

---

Die Messung erfolgte auf 96-Loch-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht, D). Zu 100 µl Probe oder Standard wurden 100 µl einer Mischung aus einer Bicinchoninsäurelösung und einer 4%igen Kupfersulfatlösung (1+49; v/v) gegeben. Die Bicinchoninsäurelösung war kommerziell erhältlich (Sigma, Bestell-Nr. B9643). Nach Verschließen der Mikrotiterplatten mit einer Selbstklebefolie (Sarstedt, Nümbrecht) wurde für 45 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde mit einem ELISA Reader (Bio Rad, München, D) die UV-Absorption bei 550 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden der Kalibrierkurve entnommen, die auf der gleichen Platte mit Standards aus BSA (1 - 100 µg/ml) aufgestellt wurde.

#### 3.4.1.3 Versuchsdurchführung

Um den oxidativen Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA durch cytosolische Fraktionen der Dünndarmenterozyten zu bestimmen, wurden Inkubationsansätze in Doppelbestimmung durchgeführt. Diese Ansätze enthielten 100 µl Assaypuffer (5-fach), 234,2 µl cytosolische Fraktion (entsprechend 1 mg Protein) sowie 5 µl Substratlösung (in Ethanol oder DMSO) und wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 500 µl ergänzt. Der Assaypuffer enthielt folgende Komponenten:

10 mM β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>; 6,5 mg/ml)

750 mM Kaliumchlorid (KCl; 56 mg/ml)

100 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES; 24 mg/ml)

10 mM Dithiothreitol (DTT; 1,5 mg/ml)

Die Stammlösung für die Substratzugabe bestand aus einer ethanolischen Lösung von all-*trans*-Retinol (0,5 mol/l). Die Lösung wurde so herunterverdünnt, daß die angestrebte Konzentration durch Zugabe von 5 µl Substratlösung zum Ansatz von 500 µl erreicht wurde, um den Lösungsmittelanteil konstant auf 1 Vol.-% zu halten. Die Herstellung einer Retinol-Stammlösung in DMSO erfolgte durch Abdampfen der ethanolischen Retinollösung unter einem Stickstoffstrom bei 40°C (Sample Concentrator, Fa. Techne, Cambridge, GB) und Wiederaufnahme des Rückstands in DMSO. Auch diese Lösung wurde so verdünnt, daß der Lösungsmittelanteil bei Zugabe zum Inkubationsansatz 1 Vol.-% betrug.

### 3 - Material und Methoden

---

Um den Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA in mikrosomalen Fraktionen der Dünndarmenterozyten zu überprüfen, wurden Inkubationsansätze in oben beschriebener Weise hergestellt. Diese enthielten 0,2 mg mikrosomales Protein pro Ansatz. Die Substratzugabe erfolgte in DMSO.

Die Inkubationen, die in Eppendorfgläsern durchgeführt wurden, erfolgten für 30 min bei 37°C unter Verwendung eines Thermomixers (Eppendorf, Hamburg). Die Reaktion wurde gestoppt, indem 400 µl des Ansatzes mit 1,2 ml Isopropanol gemischt wurden. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die ermittelten Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Inkubationsdauer und der eingesetzten Proteinmenge in Umsätze (in pmol/min/mg Protein) umgerechnet.

#### **3.4.2 *In vivo*-Metabolismus von Vitamin A im Schwein**

Um die mögliche Beteiligung des Intestinaltraktes am Metabolismus von hochdosiertem Vitamin A sowie einen möglichen Transport von Metaboliten über die Portalvene (Pfortader) zu überprüfen, wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. H.J. Rothkötter) ein Versuch an einem Schwein durchgeführt. Dabei wurde einem an Portal- und Zentralvene katheterisiertem Schwein ein Vitamin-A-Supplement verabreicht bzw. 4 Tage später Leber verfüttert. Nach Gabe von Supplement oder Leber wurde in Zeitabständen über einen Zeitraum von 24 h Blut aus der Portalvene und der Vena jugularis externa (nachfolgend zur Vereinfachung als Zentralvene bezeichnet) entnommen.

### 3 - Material und Methoden

#### 3.4.2.1 Operation

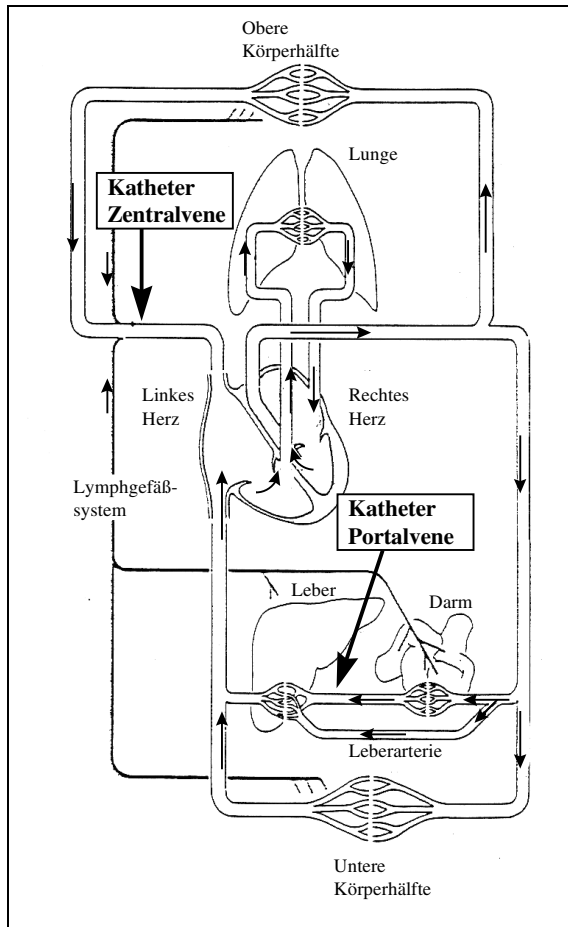


Abbildung 3.1: Lage der Katheter.

Unter allgemeiner Anästhesie wurde einem Schwein sowohl ein Portalvenen- als auch ein Zentralvenenkatheter gelegt (s. Abbildung 3.1). Dazu wurde die rechte Vena jugularis externa (= Zentralvene) mit einer Standard-Venenkanüle (äußerer Durchmesser 2,1 mm, innerer Durchmesser 1,4 mm) kanüliert, durch einen Führungsschlauch im Halsbereich nach außen geführt und in der Nackenregion fixiert. In einem zweiten Schritt wurde eine Laparotomie durchgeführt. Im Bereich des oberen jejunalen Mesenteriums wurde ein Seitenverzweigung der oberen Mesenterialvene geöffnet. Durch diese Vene wurde eine Kanüle mit oben angegebenem Durchmesser bis in die Portalvene geführt. Der Katheterzugang wurde in der rechten Flanke des Tieres ausgeleitet. Das Abdomen wurde durch Vernähen der Schichten der Abdominalwand geschlossen. Das Schwein konnte sich anschließend drei Tage von der Operation erholen und wurde

während der gesamten Versuchsdauer nicht fixiert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde dem Schwein kein Futter mehr verabreicht.

#### 3.4.2.2 Versuchsdurchführung

In aufeinanderfolgenden Teilexperimenten mit 4 Tagen Abstand wurde dem Schwein zunächst ein Vitamin-A-Supplement bestehend aus einer Retinylpalmitat-Emulsion (A-Mulsin<sup>®</sup>-Hochkonzentrat, Mucos Pharma, Geretsried, D) gemischt mit wenig Trockenfutter gegeben, dann eine Portion teilweise gebratener, teilweise roher Schweineleber verfüttert. Die Portion bestand aus roher und gebratener Leber, um sicherzustellen, daß das Tier eine ausreichende Menge aufnimmt. Bei der Emulsion handelte es sich um ein Arzneimittel, das beim Menschen zur Behandlung von

Hyperkeratosen und zur unterstützenden Therapie von bösartigen Geschwülsten eingesetzt wird. 1 g dieser Emulsion enthielt 165 mg Retinylpalmitat (entsprechend 100 mg Retinol oder 300.000 IU Vitamin A). Der Gehalt an Vitamin A wurde sowohl in der Rohleber als auch in der gebratenen Leber bestimmt. Die Berechnung der verabreichten Vitamin-A-Dosis erfolgte durch Rückwägung der nicht verfütterten Menge an Leber. In bestimmten Zeitintervallen wurde dem Schwein bis zu 24 Stunden nach Gabe des Supplements oder der Leber aus Portalvenen- und Zentralvenenkatheter Blut abgenommen, in heparinisierte Gefäße überführt und für 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das anschließend gewonnene Plasma wurde in Eppendorfgläsern bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die Verfütterung der Leber entsprach einer Dosis von 8,7 mg Retinol/kg KG (absolut 200 mg bzw. 667.000 IU Retinol). Über das Supplement wurde eine etwas geringere Dosis von 5,6 mg Retinol/kg KG (absolut 129 mg bzw. 430.000 IU Retinol) verabreicht.

### **3.5 Einfluß von Phytol/Phytansäure auf Teratogenität und Metabolismus von all-trans-RA bzw. Retinol in Mäusen**

#### **3.5.1 Teratogenitäts-Untersuchungen**

Zur vergleichenden Untersuchung der Induktion von Mißbildungen nach Gabe von all-*trans*-RA (RA, 20 mg/kg KG) oder Retinol (ROH, 50 mg/kg KG) allein oder in Kombination mit Phytol (POH, 500 mg/kg KG) oder Phytansäure (PA, 100 mg/kg KG) erhielten Gruppen von Mäusen (n = 10-12) am Gestationstag (GD) 8,25 eine orale Dosis der genannten Substanzen (s. Tabelle 3.3). Die Substanzen wurden in Cremophor EL/Wasser (25 + 75; v/v) gelöst, das Dosisvolumen betrug 5 ml/kg KG. Trächtige Kontrolltiere blieben unbehandelt. An GD 18 wurden die Mäuse nach Diethylethernarkose durch Genickbruch getötet, anschließend wurden die Uteri entnommen. Implantationen und Resorptionen wurden gezählt, die Feten herauspräpariert, einzeln gewogen und auf folgende, äußerlich sichtbare Anomalien untersucht:

- Anotie (Anomalie des äußeren Ohrs mit ein- oder beidseitig fehlender Ohrmuschel)
- Exenzephalie (Mißbildung, bei der Gehirnteile aus Schädelöffnungen heraustreten)
- Mikrognathie (abnorm kleiner Unterkiefer)
- Schwanzmißbildungen (zu kurz, gekrümmt, fehlend)
- Spina bifida (Spaltbildung im hinteren oder vorderen Teil der Wirbelsäule)

### 3 - Material und Methoden

Versuch	Substanz 1 Dosis	Substanz 2 Dosis
RA	All- <i>trans</i> -RA (RA) 20 mg/kg KG	-
RA + PA	All- <i>trans</i> -RA (RA) 20 mg/kg KG	Phytansäure (PA) 100 mg/kg KG
RA + POH	All- <i>trans</i> -RA (RA) 20 mg/kg KG	Phytol (POH) 500 mg/kg KG
ROH	Retinol (ROH) 50 mg/kg KG	-
ROH + PA	Retinol (ROH) 50 mg/kg KG	Phytansäure (PA) 100 mg/kg KG
ROH + POH	Retinol (ROH) 50 mg/kg KG	Phytol (POH) 500 mg/kg KG

Tabelle 3.3: Dosierungsschema zur Untersuchung des Einflusses von Phytol/Phytansäure auf die teratogene Wirkung und den Metabolismus von all-*trans*-RA/Retinol.

#### 3.5.2 Plasmakinetik von Retinoiden in nicht-trächtigen Mäusen

Gruppen von nicht-trächtigen Mäusen (n = 3 pro Zeitpunkt) wurden wie in Tabelle 3.3 beschrieben RA oder ROH allein oder zusammen mit POH bzw. PA oral verabreicht. Den Tieren wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach der Dosierung unter kurzer Diethylethernarkose mit heparinisierten Glas-Kapillaren (Fa. Brand, Wertheim, D) aus dem retro-orbitalen Venenplexus Blut abgenommen, aus dem durch Zentrifugation bei 1500 g Plasma gewonnen wurde. Zur Bestimmung von endogenen Kontrollwerten wurde auch unbehandelten Tieren Blut abgenommen. Die Zeitpunkte der Blutentnahme waren nach Gabe von RA allein oder mit POH/PA 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h, nach Gabe von ROH allein oder mit POH/PA 2 h, 4 h, 8 h und 12 h. Die Plasmaproben wurden anschließend mittels HPLC-Methode II/ Probenaufbereitung A (s. 3.8) auf Retinoide analysiert.

#### 3.5.3 Retinoid-Konzentrationen in embryonalem Gewebe und maternalem Plasma

Zur Bestimmung der Retinoid-Konzentrationen in Embryonen bzw. maternalem Plasma nach Gabe von RA oder ROH allein oder zusammen mit POH bzw. PA erhielten Mäuse (n = 4 pro Gruppe) an GD 11 eine orale Dosis der genannten Substanzen nach dem in Tabelle 3.3 aufgeführten Schema. Trächtige Kontrolltiere blieben unbehandelt. 4 h nach Gabe von RA allein oder mit POH/PA bzw. 8 h nach Gabe von ROH allein oder mit POH/PA wurde den Tieren wie unter 3.5.1 beschrieben Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, um Embryonen zu entnehmen. Die Proben wurden in vorgewogene Eppendorfgefäße gegeben, gewogen und bis zur Analyse unverzüglich eingefroren.

#### 3.6 Synthese von Retinylestern

Die Darstellung von Retinylestern erfolgte nach einer Modifizierung der Vorschrift von Huang und Goodman (1965) und soll am Beispiel der Herstellung von Retinyloleat (18:1-Fettsäure) exemplarisch beschrieben werden. Eine Lösung von 1 g (3,49 mmol) all-*trans*-Retinol in 20 ml trockenem Diethylether wurde im Eisbad abgekühlt und mit 0,4 ml (4,885 mmol) trockenem Pyridin versetzt. Anschließend wurden 1,63 ml (4,193 mmol) Ölsäurechlorid in 10 ml Ether zugetropft. Es wurde 1 h unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gerührt, bevor der Ansatz in 100 ml Wasser überführt wurde. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit Wasser extrahiert. Die Phasentrennung war durch partielle Hydrolyse des überschüssigen Säurechlorids erschwert und dauerte etwas länger. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde der Ether (möglichst kalt) abgezogen und das Rohprodukt mit Hexan/Essigsäureethylester (10:1, v/v) an Kieselgel chromatographiert. Man erhielt 1,2 g (65% der theoretischen Ausbeute) eines leuchtend gelben Öls. Nach Abziehen des Elutionsmittels mittels Rotationsverdampfer wurde das Öl in ein braunes Probengefäß überführt und der Rest mit Argon abgeblasen. Nach dem gleichen Verfahren wurden folgende Ester hergestellt (Fettsäure; Ausbeute in g): Retinylnonanoat (9:0; 1,1 g), Retinylaurat (12:0; 0,9 g), Retinylmyristat (14:0; 1,2 g), Retinylstearat (18:0; 1,5 g). Da man die Säurechloride von Linolsäure, Linolensäure und Arachidinsäure käuflich nicht erwerben konnte, mußten diese aus den entsprechenden Fettsäuren zunächst hergestellt werden. Dazu wurden 5 g der Fettsäure mit einem Überschuß Thionylchlorid bis zum Ende der Gasentwicklung



erwärmt. Das überschüssige Thionylchlorid wurde bei Normaldruck abdestilliert und der Rest im Wasserstrahlvakuum entfernt. Das Säurechlorid wurde als Rohprodukt weiter verwendet. Die weitere Darstellung erfolgte wie oben beschrieben. Folgende Ausbeuten wurden erzielt: Retinylinoat (18:2; 0,6 g), Retinylinolenat (18:3; 0,7 g), Retinylarachidinat (20:0; 1,3 g).

## 3.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

### 3.7.1 Verwendete Geräte

Mit Ausnahme der HPLC-Methoden V und VI (s. 3.8.2.5 und 3.8.2.6) wurden die Analysenverfahren mit einem HPLC-System durchgeführt. Die Verfahren bestanden aus einer Probenaufbereitung mit Festphasenextraktion und der Analyse mittels *reversed phase*-HPLC. Die Festphasenextraktion erfolgte jeweils unter Verwendung eines Varian AASP®-Probenaufarbeitungssystems (Varian, Darmstadt, D). Die Kartuschen (ICT, Bad Homburg, D oder Varian, Darmstadt, D) waren mit Ethyl-modifiziertem Silica-Material gefüllt (C2-Kartuschen). Das HPLC-System bestand aus einem Varian AASP®-Autoinjektor, einem Säulenofen (Applied Chromatography Systems, Macclesfield, GB), zwei Knauer Typ 64-Pumpen (gesteuert mit einem Knauer HPLC Programmer 50), einem D6-1200-Entgaser (VDS optilab, Berlin, D), einer dynamischen Mischkammer (Knauer), einem Shimadzu SPD-10AV Zweiwellenlängendetektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) sowie einem Shimadzu-Integrator C-R4A Chromatopac (Speicherung auf Computerdisketten). Durch Konvertierung der Analysendateien mittels eines von Shimadzu vertriebenen Programmes (CR4A MON) war es möglich, die Chromatogramme über die Computersoftware CLASS LC 10 zu reanalysieren und auszuwerten.

Das System für die isokratische Trennung von Retinol-Isomeren an Normalphasen-Material (HPLC-Methode V) bestand aus folgenden Komponenten: Eine Pumpe des Typs 64 von Knauer (Berlin, D), einem Rheodyne 6-Wege-Ventil, einem UV-Detektor ERC-7210 (ERC, Alteglofsheim, D) sowie einem Shimadzu-Integrator C-R4A.

Für das HPLC-System mit Diodenarray-Detektion und Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-Methode VI) wurden Geräte von Thermoseparation Products (Egelsbach, D) verwendet. Es handelte sich um ein Niederdruckgradientensystem P4000, einen Membranentgaser SCM 1000, einen Autosampler AS3000 sowie einen Diodenarray-Detektor (DAD) UV6000LP. Das Massenspektrometer LCQ war von Finnigan MAT (Egelsbach). Das Vorvakuum wurde von einer

Vakuumpumpe der Fa. Edwards (West Sussex, GB) erzeugt, das Hochvakuum durch eine in das Gerät integrierte Turbomolekularpumpe. Helium als Reaktantgas kam aus einer Druckgasflasche (20 l, 200 bar, Fa. Linde, Hannover). Da der Stickstoffverbrauch bei höheren Flußraten in der HPLC sehr groß ist, wurde Stickstoff on-line über einen ECOINERT Stickstoffgenerator (Fa. DWT, Gelsenkirchen, D) erzeugt.

#### 3.7.2 HPLC gekoppelt mit off-line Festphasenextraktion und on-line Elution

Die meisten der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden bedienten sich der on-line an die HPLC gekoppelten Festphasenextraktion unter Verwendung des AASP-Probenaufarbeitungssystems (Pearce et al. 1986). Mit diesem Gerät wurden Festphasenextraktion und Probenaufgabe mit der HPLC verbunden.

Bei konventionellen Festphasenextraktionen muß eine adsorbierte Probe mit einem Lösungsmittel wieder eluiert werden. Um die Konzentration der Probenkomponenten zu erhöhen, muß das Lösungsmittel anschließend durch Eindampfen oder Vakuumkonzentration wieder abgezogen und der Rückstand für eine Injektion in flüssiger Form in wenig Eluent aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu wird die AASP-Kartusche, von denen zehn zu einer Kassette zusammengefaßt sind, nach erfolgter off-line Probenextraktion an einer Probenvorbereitungs-Station (*prep station*) in einer druckfesten Kammer direkt in das HPLC-System eingebunden (s. Abbildung 3.2). Nach einer Ventilumschaltung wird sie von dem HPLC-Fließmittel durchströmt und die Probe dadurch auf die analytische Trennsäule eluiert. Die HPLC-Methoden I-IV wurden unter Verwendung dieses Gerätes durchgeführt. Dabei war immer ein bestimmtes Probenaufbereitungsverfahren (A-C) unter Verwendung der *prep station* mit einer der HPLC-Methoden (I-IV) gekoppelt. Eine übersichtliche und zusammenfassende Darstellung ist in Tabelle II des Anhangs aufgeführt. Die Probenaufbereitungsverfahren beinhalteten die Konditionierung, die Probenaufgabe und einen Waschschrift.

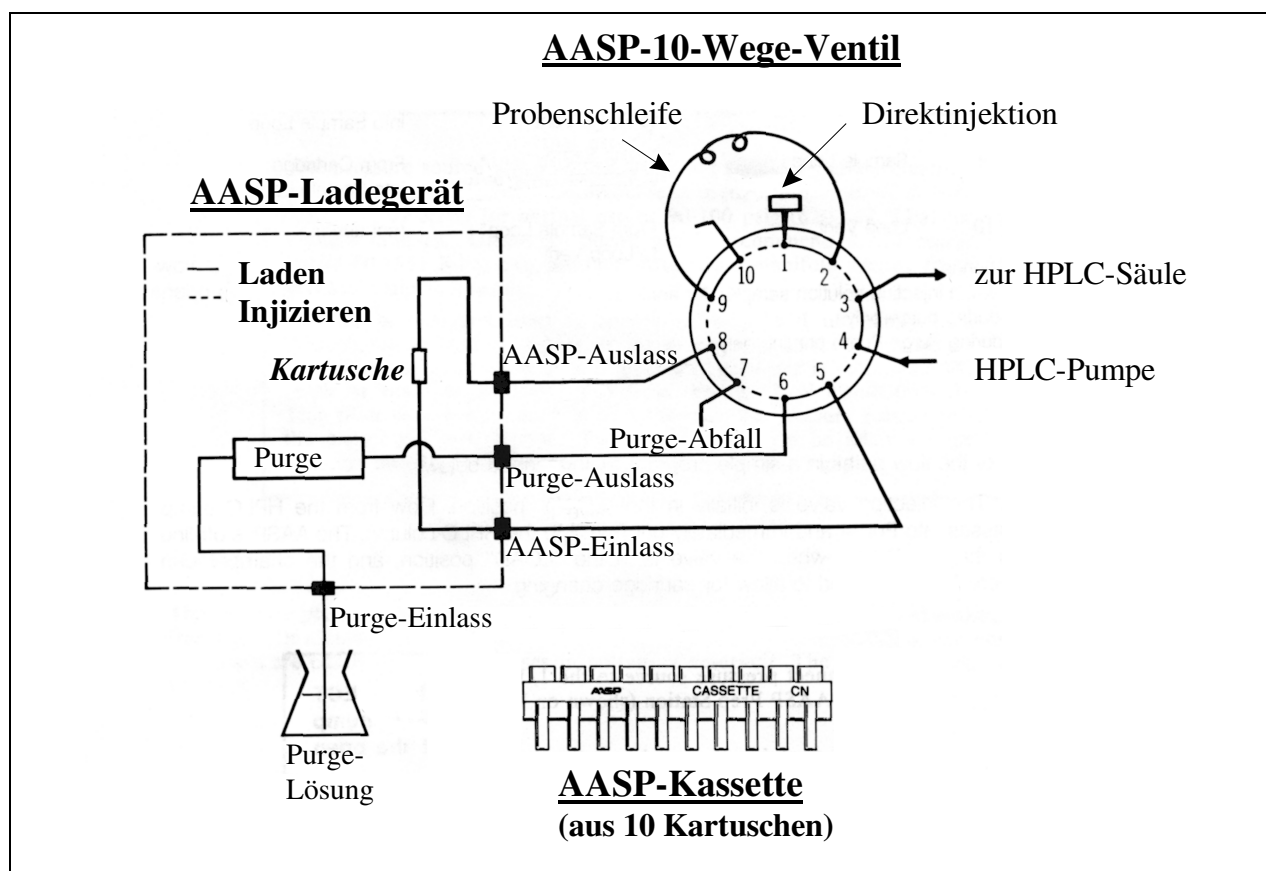


Abbildung 3.2: Verbindungen im AASP-HPLC-System.

Die Konditionierung der Kartuschen erfolgte grundsätzlich mit mindestens 3,2 ml Methanol und anschließend 0,6 ml 2%iger wässriger Ammoniumacetatlösung. Der eigentlichen HPLC-Trennmethode war immer ein Spülschritt der in die druckfeste Kammer des AASP-Aufgabegerätes gepressten Kartusche vorgeschaltet. Die Zusammensetzung der Spüllösung wurde dabei so gewählt, daß die Elutionskraft nicht ausreichte, um die interessierenden Analyten von der Festphase zu waschen, sondern nur die in den Kartuschen befindliche Luft herauszudrücken, bevor die Substanzen auf die analytische Säule eluiert wurden. Für die Methoden I-III erfolgte die chromatographische Trennung auf Säulen von 120 x 4 mm, für HPLC-Methode IV auf Säulen mit 60 x 4 mm, die wie unter 3.1.2 beschrieben selbst gepackt wurden.

#### 3.7.3 HPLC-Kopplung mit Diodenarray-Detektion (DAD) und Massenspektrometrie (MS)

Zur Kopplung von HPLC mit Diodenarray- und massenspektrometrischer Detektion wurde das unter 3.7.1. beschriebene System verwendet. Der Diodenarray-Detektor stellte hierbei eine Neuerung dar. Er wies bei gleichem Zellvolumen eine 5-fach längere Meßzelle auf als die herkömmlichen Detektoren („Lightpipe-Technologie“). Um Verluste der Strahlungsintensität aufgrund des größeren Lichtweges zu vermeiden, war diese Zelle mit einer totalreflektierenden Schicht versehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob durch Verwendung dieser Technik in Bezug auf die Retinoid-Analytik ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wurde.

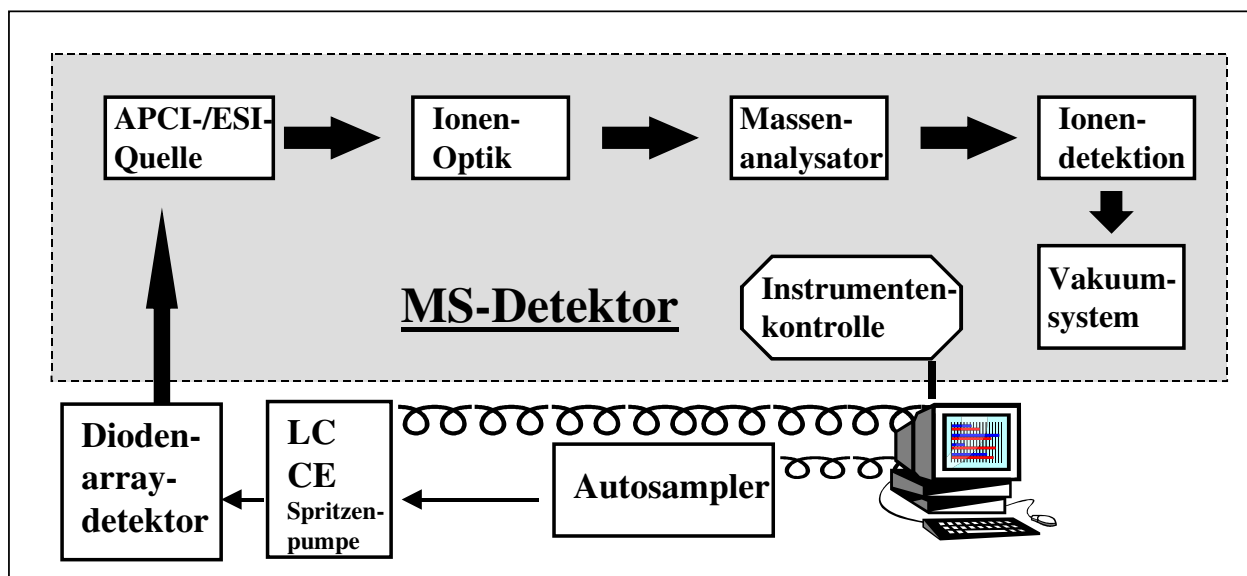


Abbildung 3.3: Genereller Aufbau des LC-MS-Systems.

Der MS-Detektor LCQ (genereller Aufbau s. Abbildung 3.3), der mit LC- oder Kapillarelektrophorese-Systemen koppelbar war, ließ sich über eine am Gerät angebrachte Spritzenpumpe auch ohne vorgeschaltete Trennung verwenden. Die Spritzenpumpe diente außerdem der Abstimmung der Geräteparameter für das jeweilige Detektionsproblem („Tunen“). Über sie konnten Standardlösungen der interessierenden Analyten direkt in das MS injiziert werden, um die Einstellungen für eine optimale Signalstärke zu ermitteln. Als Ionenquelle standen die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)

sowie die Elektrospray-Ionisation (ESI), ebenfalls durchgeführt unter Atmosphärendruck, zur Verfügung.

Die Ionenoptik diente der weiteren Fokussierung der Ionen und setzte sich aus zwei Oktapolen zusammen, in deren Mitte eine Interoktapol-Linse positioniert war. Der Massenanalysator bestand aus einer Ionenfalle („Ion Trap“) mit Ringelektrode, an deren Eintritts- und Austrittsstelle weitere Elektroden angebracht waren, die das Sammeln („Trappen“) von Molekülen und Molekülfragmenten und somit die bis zu 10-fache Fragmentierung einzelner Ionen ermöglichte (MS<sup>n</sup>-Technik). Das Ionendetektions-System beinhaltete eine Konversionsdynode, einen Elektronenvervielfacher und eine Anode, die die an der Dynode und am Vervielfacher erzeugten Elektronen in einen messbaren Strom umwandelte. Die Spannungsdifferenz von der Ionenquelle bis zur Ionendetektion betrug bis zu -20 kV bei einer Spannung von 3-5 kV an der Ionenquelle und -15 kV an der Konversionsdynode (im *positive ion mode*). Das Vakuumsystem sorgte für einen Unterdruck-Gradienten, der von Atmosphärendruck (760 Torr) in der Ionenquelle über einen Druck von 1 Torr in der geheizten Kapillare, 10<sup>-3</sup> Torr in der Ionenoptik und 2x10<sup>-5</sup> Torr im Analysator reichte. Die Ionendetektion erfolgte entweder im MS- oder im MS-MS-Modus. Weitere Details zur Analytik sind in 3.8.2.6 beschrieben.

#### **3.7.4 Probenaufbereitung für die Retinoid-Analytik**

##### 3.7.4.1 Verwendete Geräte

Zur Zentrifugation wurde eine Microfuge R (Beckman, München, D) oder eine Biofuge pico (Heraeus, Hanau, D) benutzt. Ultraschallbehandlung erfolgte entweder unter Verwendung von Ultraschallbädern (Sonorex RK, Bandelin, Berlin) oder von Ultraschallfingern (B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA oder MS72, Bandelin). Soweit erforderlich wurde zum Zerkleinern von Proben ein IKA Ultra Turrax T8 (Jancke & Kunkel, Staufen, D) benutzt. Zum Einwiegen wurde eine Mikropräzisionswaage von Sartorius (Göttingen, D) verwendet. Das Vortexen erfolgte mit einem Heidolph Reax 2000 (Kelheim, D). Das Schütteln von Probegefäßen wurde mit einem Mixer 5432 oder einem heizbaren Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, D) durchgeführt. Das Abblasen von Proben unter Stickstoff erfolgte mit einem Techne Sample Concentrator (Techne, Cambridge, GB).

### *3 - Material und Methoden*

---

#### 3.7.4.2 Feste Proben (Gewebe)

Embryonale Proben wurden aufgearbeitet wie von Collins et al. (1992) beschrieben: Das Gewebe wurde in ein vorgewogenes Eppendorfgefäß gegeben und mit 3 Volumina Isopropanol versetzt. Durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallfinger wurden die Gewebe unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde entsprechend der Probenaufbereitung A (3.8.1.3) weiter bearbeitet.

Für die Messung der Retinoide in Leberproben wurde zunächst mit 9 Volumina eiskalter NaCl-Lösung (0,9 %) im Potter-Elvehjem-Glas-Teflon-Homogenisierer homogenisiert (Sass 1996). Je nach dem zu erwartenden Vitamin-A-Gehalt wurden die Homogenate nochmals 1:5 bis 1:10 verdünnt. 200 µL des so erhaltenen Materials wurde mit 600 µL Isopropanol versetzt und weiter gemäß Probenaufbereitung A bearbeitet.

#### 3.7.4.3 Probenaufbereitung A

Dieses Aufarbeitsverfahren stellte die Grundlage für die meisten Probenaufbereitungen dar, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die Methode war sowohl auf flüssige als auch auf feste Proben anwendbar. Für die Untersuchung von Plasma- oder Enzymassay-Proben wurde entsprechend der Vorschrift von Collins et al. (1992) 1 Volumen Probe (meist 100 - 150 µL) mit 3 Volumina Isopropanol gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei ca. 6500 g und Raumtemperatur wurden 400 µl des erhaltenen Überstandes mit drei Volumina wässriger Ammoniumacetatlösung (2 %) verdünnt und über eine vorkonditionierte C2-Kartusche gegeben, durch die anschließend noch 1,5 ml einer Waschlösung aus 85 Teilen 2 %iger Ammoniumacetatlösung und 15 Teilen Acetonitril gepreßt wurden, bevor die Kartusche in den Varian AASP®-Autoinjektor geladen wurde. In Verbindung mit HPLC Methode III wurden nacheinander zweimal 400 µl Probe auf die Kartusche gegeben, um die Nachweisempfindlichkeit für die Bestimmung von Retinsäuren mit dieser Methode zu steigern. Es stellte sich heraus, daß dadurch die Wiederfindung der 4-oxo-Retinsäuren deutlich verringert war, da sie durch den zweiten Auftragsschritt bereits wieder von der Kartusche eluiert wurden. Die Wiederfindung von RAG- oder RA-Isomeren blieb dadurch jedoch unverändert. Vorgeschaltete Homogenisierung erlaubte auch die Aufbereitung embryonaler Gewebeproben mit diesem Verfahren.

### *3 - Material und Methoden*

---

#### 3.7.4.4 Probenaufbereitung B

Die von Eckhoff und Nau (1990) für die Bestimmung von endogen vorkommenden Mengen an Retinsäuren und 4-oxo-Retinsäuren entwickelte Methode wurde für die Analyse von Humanplasma angewendet. In Abweichung von der Originalmethode wurde auf einen internen Standard verzichtet, um eine Koelution mit bisher nicht identifizierten Retinoiden auszuschließen. Nach Zentrifugation der Plasmaproben für 10 min bei 4°C und 1500 g wurden jeweils 350 µl Probe mit 600 µl einer 2 %igen Ammoniumacetatlösung und 600 µl einer Lösung aus 35 ml Acetonitril und 65 ml 2 %iger Ammoniumacetatlösung über eine vorkonditionierte C2-Kartusche extrahiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1,5 ml einer Lösung aus 85 Teilen 0,5 %iger Ammoniumacetatlösung und 15 Teilen Acetonitril konnte die Kartusche in den Autoinjektor geladen werden.

#### 3.7.4.5 Probenaufbereitung C

Dieses Verfahren zur Extraktion von Retinol und Retinylestern (Collins et al. 1992) wurde nur für die Analyse einiger Leberproben eingesetzt. 100-µL-Aliquots homogenisierter und eventuell weiter verdünnter Leber wurden mit 550 µL Interner-Standard-Lösung versetzt. Diese Lösung enthielt 2,6-di-tert-butyl-p-Kresol (BHT; 0,0125 %; w/v) als Antioxidans sowie Etretinol ((all-E)-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-Nonatetraen-1-ol) und Retinyl-nonanoat als interne Standards (gelöst in Isopropanol). Nach gründlichem Mischen und Zentrifugieren (6500 g, 3 min bei Raumtemperatur) wurden 550 µL Überstand mit 1,17 ml wässriger Ammoniumacetatlösung (0,5 %) verdünnt auf eine vorkonditionierte C2-Kartusche gegeben. Nachdem die Probe durch die Kartusche geflossen war, wurde mit 1,7 ml einer Mischung von Acetonitril und Wasser (30 + 70; v/v) gewaschen und die Kartusche anschließend in den Autoinjektor geladen.

#### 3.7.4.6 Probenaufbereitung D

Diese Probenaufbereitung diente der Bestimmung von geometrischen Isomeren des Retinols in Leberproben und sporadisch in Plasmaproben. Dazu mußten die in der Leber überwiegend vorhandenen Retinylester zunächst schonend zu Retinol hydrolysiert werden. Da die

### 3 - Material und Methoden

---

herkömmlichen Methoden der alkalischen Verseifung von Retinylestern hohe Temperaturen zur Hydrolyse benötigten und dadurch ein Abbau sowie eine Umwandlung von Retinol-Isomeren erfolgen konnte, wurde eine enzymatische Hydrolysemethode zur Freisetzung der Retinol-Isomere angewendet. Als geeignet hierfür erwies sich die pankreatische Cholesterolesterase (EC 3.1.1.13), die die Retinylester-Hydrolyse mit etwa 1/5. der Hydrolyserate von Cholesteryloleaten katalysierte (Harrison und Gad 1989). Die enzymatische Reaktion war durch den Zusatz von Cholaten stimulierbar. Um die in der Leber vorhandenen Retinylester schonend zu hydrolysieren, wurden 400 µl eines verdünnten Leberhomogenats (s. 3.7.1.1) oder 400 µl Plasma mit 30 µl einer wässrigen Natriumcholatlösung (300 mM) und 20 µl Cholesterolesterase (gelöst in Sörensen<sup>1</sup> Puffer pH 7,0, eingestellt auf 20 Einheiten/ml) versetzt. Die Probe wurde kurz gevortext und anschließend in einem heizbaren Schüttelreaktor 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 750 µl einer 2%igen, wässrigen Ammoniumacetatlösung zugegeben und 3 min geschüttelt. 1 ml dieses Ansatzes wurde auf eine Säule gegeben, die Diatomeenerde enthielt (Extrelut 1 Fertigsäulen, Merck, Darmstadt, D). Nach 20 Minuten Wartezeit wurden lipophile Komponenten mit 5 ml n-Hexan in ein Spitzkolbenröhrchen eluiert. Der Eluent wurde mittels eines sanften Stickstoffstroms abgeblasen, der Rückstand anschließend in 200 µl n-Hexan wieder aufgenommen. Die so erhaltene Lösung wurde dann für die HPLC verwendet.

#### 3.7.4.7 Probenaufbereitung E

Zur weiteren Identifizierung von möglichen Retinoid-Metaboliten mittels LC-DAD-MS<sup>n</sup> wurden Peakfraktionen in Eppendorfgefäßen gesammelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit einem Vakuum-Konzentrator (Alpha RVC, Christ, Osterode, D) bei Raumtemperatur und einem Vakuum von 1 mbar abgezogen. Nach vollständigem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Konzentrator mit Stickstoff belüftet. Der im Eppendorfgefäß befindliche Rückstand wurde in 100 µl Lösungsmittel (60 mM aq. Ammoniumacetat/Methanol; 43+57; v/v) aufgenommen, ein Aliquot davon wurde injiziert.

Die Aufarbeitung von Plasma- und Fetusproben für die LC-DAD-MS<sup>n</sup> erfolgte gemäß Probenaufbereitung A auf C2-Kartuschen. Die auf der Kartusche retenierten Substanzen wurden

---

<sup>1</sup> Gemisch aus zwei Puffern (Zusammensetzung je nach gewünschtem pH-Wert); A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9,078 g/l (= 1/15. mol/l), B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 11,876 g/l (= 1/15. mol/l)



mit 1,5 ml Methanol wieder eluiert und in Probengefäße überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel wie oben beschrieben mittels Vakuumkonzentration entfernt, der Rückstand in 100 µl aufgenommen und ein Aliquot davon injiziert.

#### **3.7.5 Verfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Retinoid-Analytik**

Die eingesetzten HPLC-Methoden unterschieden sich nach Art der eingesetzten Eluenten sowie nach Gradienten-Verlauf, Säulentemperatur und Flußrate der mobilen Phase. Mit Ausnahme der Methode V nutzten die Verfahren binäre, lineare Gradienten. Die Verwendung des Shimadzu-Detektors für die Methoden I-III erlaubte die Detektion bei zwei Wellenlängen gleichzeitig (340 und 356 nm). Durch Berechnung von Peakflächen-Verhältnissen bei diesen Wellenlängen, die mit denen von Standardsubstanzen verglichen werden konnten, ließen sich die Identitäten vermutlicher Retinoid-Peaks bestätigen und eventuelle Verunreinigungen erkennen.

Kalibriert wurde auf Grundlage der Peakflächen von Standardretinoiden mit bekannten Konzentrationen. Dabei diente *all-trans*-RAG auch als Referenzsubstanz für andere RAG-Isomere. Retinylpalmitat und -oleat ließen sich unter den Bedingungen nicht trennen und wurden beide als Retinylpalmitat quantifiziert. Die Kalibrierfaktoren anderer Retinylester (hauptsächlich Retinylstearat, -linoleat und -linolenat) wurden auf Grundlage des Kalibrierfaktors für Retinylpalmitat unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte berechnet, da mittel- und langkettige Retinylester den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten besitzen (Furr et al. 1994). Zur Herstellung von Mischstandards wurde aus den Stammlösungen ein Gemisch in Ethanol hergestellt, in dem alle Komponenten eine Konzentration von 10.000 ng/ml hatten. Dieser Mischstandard konnte dann weiter verdünnt werden. Um in den Kalibrierstandards die biologische Matrix zu simulieren, wurden diese Lösungen im letzten Verdünnungsschritt 1:10 mit einer 5 %igen Lösung von BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt. Die Standards wurden wie für die Proben beschrieben der Festphasenextraktion unterworfen.

### 3 - Material und Methoden

#### 3.7.5.1 HPLC-Methode I

Diese Methode diente der Bestimmung von polaren Retinoiden (RA-, 4-oxo-RA-, 4-hydroxy-RA- und RAG-Isomere sowie 14-HRR) und wurde in Kombination mit Probenvorbereitung B zur Analytik von Humanplasma eingesetzt (Eckhoff und Nau 1990, Eckhoff et al. 1990). In Abweichung von der in der Literatur beschriebenen Methode wurde der pH-Wert der wässrigen Lösung nicht auf 5,75 eingestellt, um eine Koelution von all-*trans*-RA mit 14-HRR zu verhindern.

Spüllösung	Methanol / 0,5%ige aq. Ammoniumacetat (15 + 85; v/v)	
Fließmittel A	Methanol / 60 mM aq. Ammoniumacetat (50 + 50; v/v)	
Fließmittel B	Methanol	
Fluß	0,7 ml/min	
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Fließmittel B
	0,0	15
	11,0	90
	11,2	99
	12,0	99
	13,0	15
Säule	Spherisorb ODS 2, 3 µm, 120 mm x 4 mm i. D.	
Temperatur	60 °C	
Detektion	UV, 340 nm und 356 nm	

Tabelle 3.4: Bedingungen der HPLC-Methode I.

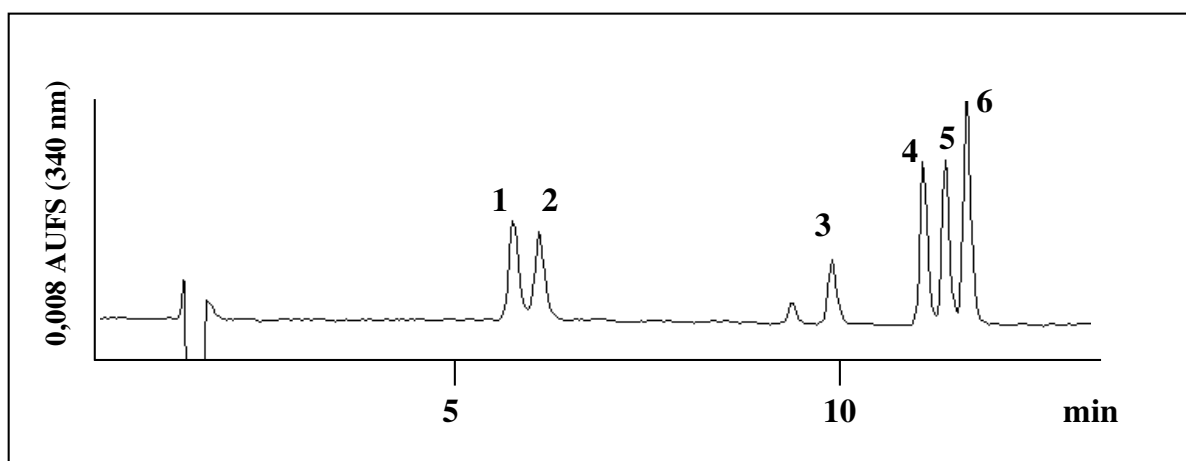


Abbildung 3.4: Bestimmung polarer Retinoide mittels HPLC-Methode I / Probenaufbereitung B: 1: all-*trans*-4-oxo-RA, 2: 13-*cis*-4-oxo-RA (koeluiert mit all-*trans*-4-hydroxy-RA), 3: all-*trans*-RAG, 4: 13-*cis*-RA, 5: 9-*cis*-RA, 6: all-*trans*-RA (je 10 ng/ml).

### 3 - Material und Methoden

#### 3.7.5.2 HPLC-Methode II

In Abweichung von der Originalmethode (Methode I) wurde für eine Reihe von Analysen nach 11,2 min der Anteil des Eluenten B auf 99 % erhöht und bis 30 min beibehalten, um auch Retinol und Retinylester bestimmen zu können (Tzimas et al. 1994; Sass et al. 1995). Sollte nur Retinol zusätzlich bestimmt werden, so wurde die Laufzeit nur auf 17 min verlängert. Die Anwendung dieser Methode erfolgte in Verbindung mit Probenaufbereitung A.

Spüllösung	Methanol / 0,5%ige aq. Ammoniumacetat (15 + 85; v/v)	
Fließmittel A	Methanol / 60 mM aq. Ammoniumacetat (50 + 50; v/v)	
Fließmittel B	Methanol	
Fluß	0,7 ml/min	
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Fließmittel B
	0,0	15
	11,0	90
	11,2	99
	12,0	99
	30,0 (17,0)	99
	31,0 (18,0)	15
Säule	Spherisorb ODS 2, 3 µm, 120 mm x 4 mm i. D.	
Temperatur	60 °C	
Detektion	UV, 340 nm und 356 nm	

Tabelle 3.5: Bedingungen der HPLC-Methode II.

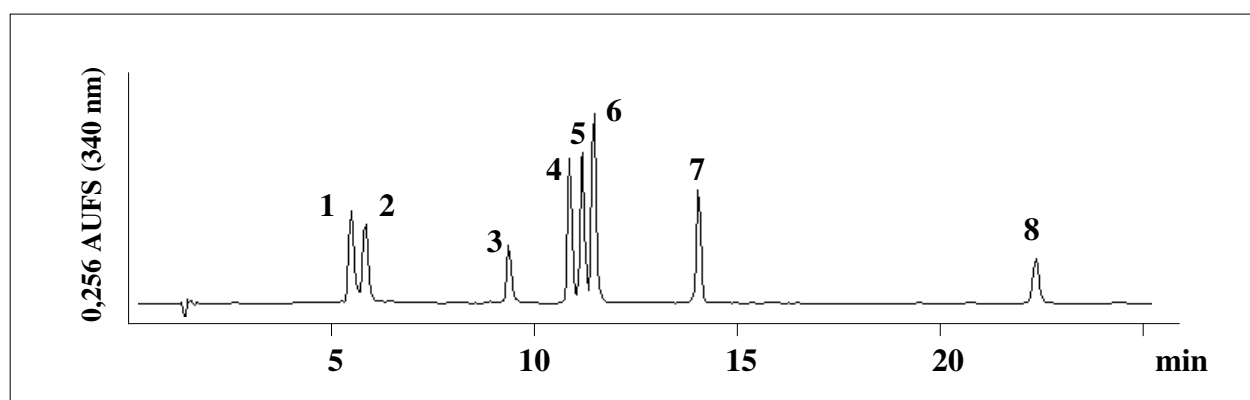


Abbildung 3.5: Bestimmung polarer und unpolarer Retinoide mittels HPLC-Methode II / Probenaufbereitung A: 1-6: (s. Abbildung 3.6), 7: Retinol, 8: Retinylpalmitat (je 1000 ng/ml).

### 3 - Material und Methoden

#### 3.7.5.3 HPLC-Methode III

Da bei Anwendung von HPLC-Methode I/Probenaufbereitung A 9,13-di-*cis*-RA nicht erfaßt werden konnte und mit HPLC-Methode II/Probenvorbereitung B dieser Metabolit mit 13-*cis*-RA koeluierte, wurde diese Methode angewendet, um auf das Vorkommen von 9,13-di-*cis*-RA zu prüfen und diesen Metaboliten gegebenenfalls quantitativ zu bestimmen. Die Methode erlaubte die Trennung aller bisher *in vivo* beschriebenen RA-Isomere (13-*cis*-RA, 9,13-di-*cis*-RA, 9-*cis*-RA, all-*trans*-RA) und RAG-Isomere (13-*cis*-RAG, 9-*cis*-RAG, all-*trans*-RAG) in einem einzigen HPLC-Lauf (Sass und Nau 1994). In Abweichung von der in der Literatur beschriebenen Methode wurde der Elutionsschritt mit 99% Acetonitril verlängert, um in den Proben (Humanplasma) vorhandenes Retinol sowie Retinylester vor der nächsten Analyse von der Säule zu eluieren.

Spüllösung	Wasser	
Fließmittel A	Wasser mit 0,2 Vol.-% Trifluoressigsäure	
Fließmittel B	Acetonitril mit 0,2 Vol.-% Trifluoressigsäure	
Fluß	0,7 ml/min	
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Fließmittel B
	0,0	30
	30,0	75
	35,5	75
	36,0	99
	46,0	99
	49,0	30
Säule	Spherisorb ODS 2, 3 µm, 120 mm x 4 mm i. D.	
Temperatur	60 °C	
Detektion	UV, 340 nm und 356 nm	

Tabelle 3.6: Bedingungen der HPLC-Methode III.

### 3 - Material und Methoden

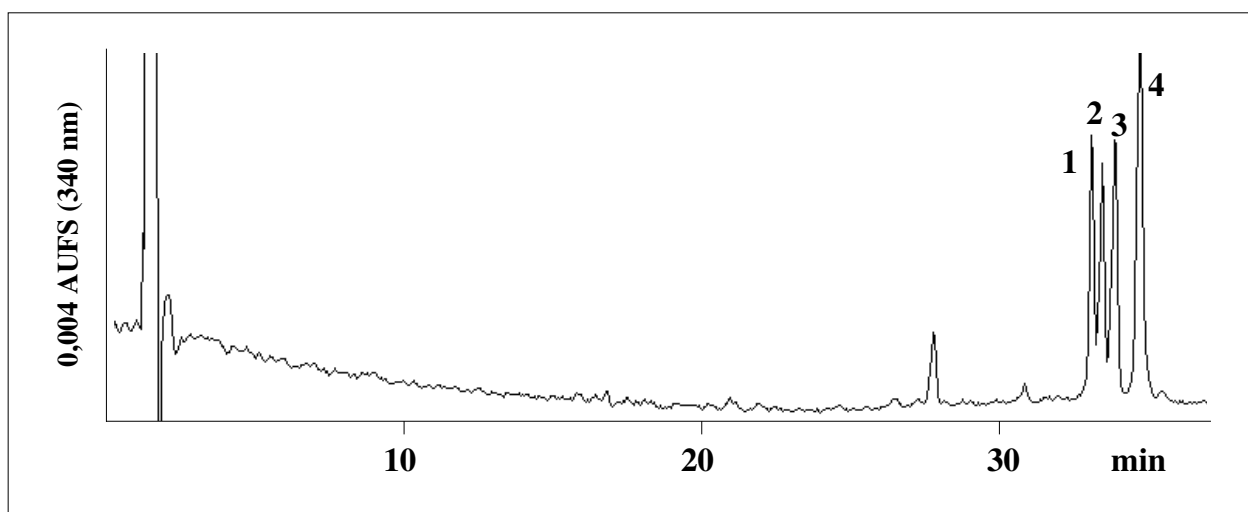


Abbildung 3.6: Bestimmung der RA-Isomere mittels HPLC-Methode III / Probenaufbereitung A: 1: 13-cis-RA, 2: 9,13-di-cis-RA, 3: 9-cis-RA, 4: all-trans-RA (je 20 ng/ml).

#### 3.7.5.4 HPLC-Methode IV

Diese Methode zur Bestimmung von Retinol und Retinylestern (Collins et al. 1992) wurde zur Analytik von Leberproben in Verbindung mit Probenaufbereitung C eingesetzt, da innerhalb einer sehr kurzen Analysenzeit (8 min) Retinol, Retinylester sowie die internen Standards *all-trans*-Eretinol und Retinylnonanoat (9:0) getrennt werden konnten. Polare Retinoide konnten mit dieser Methode nicht gemessen werden.

Spüllösung	Methanol / 0,1%ige aq. Ammoniumacetatlösung (45 + 55, v/v)	
Fließmittel A	Methanol / 60 mM aq. Ammoniumacetat (85 + 15, v/v)	
Fließmittel B	Isopropanol / Aceton (1000 + 1,25, v/v)	
Fluß	0,9 ml/min	
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Fließmittel B
	0,0	0
	2,0	50
	7,0	60
	8,0	0
Säule	Spherisorb ODS 2, 3 µm, 60 mm x 4 mm i. D.	
Temperatur	45 °C	
Detektion	UV, 325 nm	

Tabelle 3.7: Bedingungen der HPLC-Methode IV.

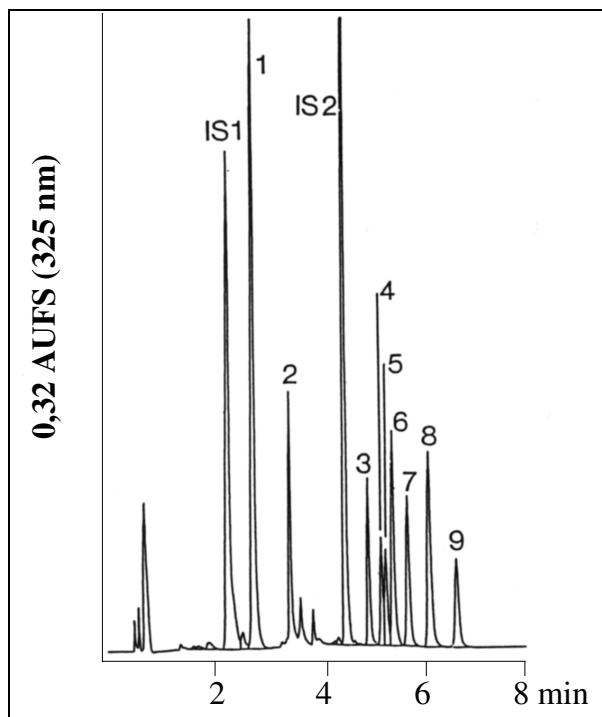


Abbildung 3.7: Bestimmung von Retinol und Retinylestern mittels HPLC-Methode IV / Probenaufbereitung C. 1: Retinol; 2: Retinylacetat (2:0); 3: Retinylaurat (12:0); 4: Retinylinolenat (18:3); 5: Retinylmyristat (14:0); 6: Retinylinoleat (18:2); 7: Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1); 8: Retinylstearat (18:0); 9: Retinylarachidinat (20:0); IS1: Interner Standard All-trans-Etretinol; IS2: Interner Standard Retinylnonanoat (9:0).

#### 3.7.5.5 HPLC-Methode V

Zur Bestimmung von Retinol-Isomeren in Leberproben oder in Humanplasma wurde eine Trennmethode an „*narrow bore*“-Säulen (ID 2 mm) gefüllt mit Normalphasen-Material angewendet (Brinkmann et al. 1995). Ein nach Probenvorbereitung D erhaltenes Aliquot der Hexanphase wurde über eine 20 µl-Injektionsschleife injiziert. Da nicht alle Retinol-Isomere kommerziell erhältlich waren, erfolgte die Kalibrierung der Methode durch eine Standardmischung aus geometrischen Isomeren von Retinylpalmitat in 5%iger BSA-Lösung (in Konzentrationen von 50, 200, 500, 1000 oder 2000 ng/ml, berechnet als Retinol). Diese Standardmischungen wurden wie für die Proben beschrieben der Probenaufbereitung D unterzogen. Während der Probenaufbereitung wurde eine artifizielle Isomerisierung von all-*trans*-Retinol zu 13-*cis*-Retinol beobachtet. Durch Kontrollexperimente mit einer frisch hergestellten Stammlösung all-*trans*-Retinol wurde die Quelle der Isomerisierung ermittelt. Die Isomerisierung trat auch ohne enzymatische Inkubation während des Verweilens auf dem Kieselgur auf und war vermutlich auf Schwermetallspuren in dem Material zurückzuführen. Verwendung von Material anderer Hersteller (ChemElut<sup>®</sup> oder ToxElut<sup>®</sup>, Varian, Darmstadt) brachte keine Besserung. Die

### 3 - Material und Methoden

Isomerisierung von all-*trans*-Retinol zu 13-*cis*-Retinol betrug 4%, andere Isomere traten bei diesen Kontrollexperimenten nicht auf.

Fließmittel	n-Hexan / n-Oktanol (997 + 3, v/v)
Fluß	0,4 ml/min
Säule	Spherisorb SW, 3 µm, 100 mm x 2 mm i. D. mit Vorsäule (7 mm x 2 mm i.D.)
Temperatur	Raumtemperatur
Detektion	UV, 325 nm

Tabelle 3.8: Bedingungen der HPLC-Methode V.

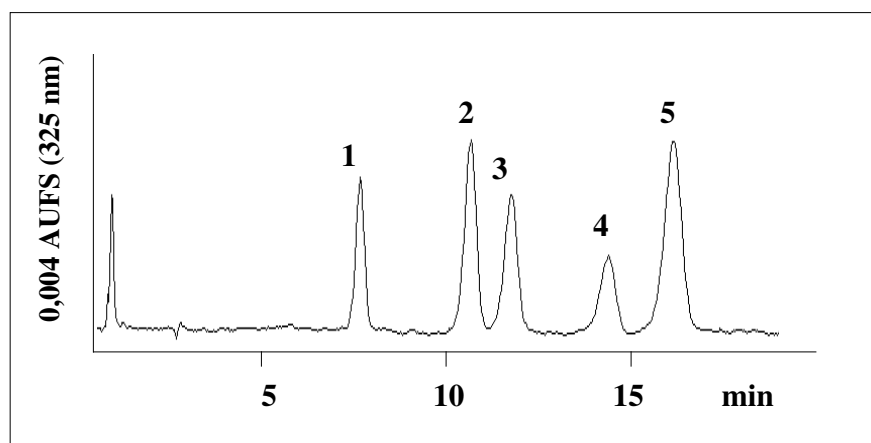


Abbildung 3.8: Bestimmung von Retinol-Isomeren mittels HPLC-Methode V / Probenaufbereitung D: 1: 11,13-di-*cis*-; 2: 13-*cis*-; 3: 9,13-di-*cis*-; 4: 9-*cis*-; 5: all-*trans*-Retinol.

#### 3.7.5.6 HPLC-Methode VI

Die Analysenparameter der HPLC-Methode I wurden auch auf das zum Ende dieser Arbeit neu installierte LC-System mit Diodenarray- (DAD) und MS<sup>n</sup>-Detektion übertragen (s. 3.6.3). Mit dieser Methode sollte zunächst ermittelt werden, wie empfindlich die MS<sup>n</sup>-Detektion gegenüber der für Retinoide sehr vorteilhaften UV-Detektion bei 340 und 356 nm sein kann. Im weiteren Verlauf wurde das LC-MS-System unter Anwendung dieser Methode auch eingesetzt, um gesammelte Peakfraktionen zu rechromatographieren und die Identität möglicher Retinoid-Peaks zu bestätigen. Schließlich wurden auch Plasma- und embryonale Gewebeproben von Mäusen nach Behandlung mit all-*trans*-RA analysiert. Die Grundeinstellungen des MS waren dabei wie folgt:

### 3 - Material und Methoden

Ionisierungs-Modus:	APCI	Quellenspannung:	6 kV
Polarität:	Positiv-Ionen	Fluß Sheath Gas:	60 ml/min
Temperatur (Kapillare):	150°C	Fluß Aux Gas:	0 ml/min
Temperatur (APCI Vaporizer):	450°C		

Für die MS-MS-Experimente wurden je nach der zu detektierenden Substanz innerhalb eines HPLC-Laufes verschiedene Fragmentierungssegmente (s. Tabelle 3.9) angewendet. Zwei dieser Segmente überlappten sich zeitlich, so daß die Analyse der Plasma- und Gewebeprobe zur Bestimmung von 4-oxo-RA- bzw. 4-hydroxy-RA-Isomeren zweimal hintereinander erfolgte.

Segment	Zeit	Substanzgruppe	Parent Mass	Scan-Bereich (MS-MS)
1a	0-7 min	4-oxo-RA	m/z 315	270-300
1b	0-7 min	4-hydroxy-RA	m/z 299	80-300
2	7-11 min	RA und RAG	m/z 301	200-260

Tabelle 3.9: Fragmentierungssegmente für die LC-MS-MS-Experimente.

## 3.8 Methoden zur weiteren Identifizierung von Retinoid-Metaboliten

### 3.8.1 Enzymatische Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase zur Identifizierung von Retinoid-Glukuroniden

Zur weiteren Identifizierung von Retinoidkonjugaten mit Glukuronsäure wurden die entsprechenden Proben (Plasma oder Urin) mit  $\beta$ -Glukuronidase aus *Escherichia coli* (E.C.3.2.1.3.1.; Boehringer Mannheim, Mannheim, D) inkubiert (Sass et al. 1994). Durch enzymatische Hydrolyse der Konjugate wurde das Aglykon gewonnen, so daß an der Elutionsstelle der Retinoidglukuronide kein Signal mehr auftrat und die Signalstärke des entsprechenden Aglykons anstieg. Im allgemeinen wurden 150  $\mu$ l Probe mit 20  $\mu$ l Enzympräparation oder Wasser in einem Schüttelinkubator bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Probenaufarbeitung nach Methode A (Isopropanolextraktion). Als Positivkontrolle wurde ein RAG-Standard in BSA verwendet.



#### 3.8.2 GC/MS von Retinsäuren nach Methylierung

Gaschromatographie gekoppelt mit massenselektiver Detektion (GC-MS) wurde angewendet, um die Identität möglicher Isomere der Retinsäure, die in Humanplasma nach Verzehr einer Lebermahlzeit auftraten, qualitativ zu bestätigen (Tzimas et al. 1996). Um ein Säurederivat zu erhalten, das mittels GC bestimmt werden konnte, mußte eine Methylierung der Carboxylfunktion durchgeführt werden. Gesammelte HPLC-Fractionen, die mögliche Retinsäure-Isomere enthielten, oder ethanolische Retinsäure-Standardlösungen wurden in braune Reaktionsgefäße aus Glas überführt, anschließend wurde das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene abgezogen (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Bierbeek, B). 20 µl einer ethanolischen Lösung mit all-*trans*-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-RA wurden als interner Standard hinzugegeben. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl einer Diazomethan-Lösung in Diethylether. Die Reaktionsgefäße wurden dicht verschlossen und zur Derivatisierung 20 min bei Raumtemperatur belassen. Das Lösungsmittel wurde dann wieder abgezogen, der Rückstand in 20 µl n-Hexan aufgenommen. 1 µl Aliquots dieser Lösungen wurden über einen kalten *on-column* Injektor des GC-MS-Systems injiziert. Das System bestand aus einem HP 5890 Gaschromatographen gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor 5971A und einer DOS-Chemstation (alle Geräte von Hewlett-Packard, Waldbronn, D). Eine Trennung wurde erzielt auf einer HP Ultra 1 Kapillarsäule (25 m Länge, 0,2 mm Durchmesser, 0,33 µm Filmdicke) mit Helium als Trägergas und einer Flußrate von 0,5 ml/min. Die Ofentemperatur war anfänglich auf 110°C gesetzt und stieg dann mit 30°C/min auf 230°C und wurde 2 min auf dieser Temperatur gehalten. Der massenselektive Detektor wurde im Modus der Chemischen Ionisierung (CI) mit Isobutan als Reaktantgas betrieben. Chromatogramme wurden im SIM-Modus aufgenommen. Als Massenspuren wurden  $m/z=315$  für Methylester der RA-Isomere und  $m/z=319$  für all-*trans*-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-RA verwendet. Unter den genannten Bedingungen wurden die Methylester der RA-Isomere in folgender Reihenfolge detektiert: 9-*cis*-RA/9,13-di-*cis*-RA (Koelution), 13-*cis*-RA, all-*trans*-RA.

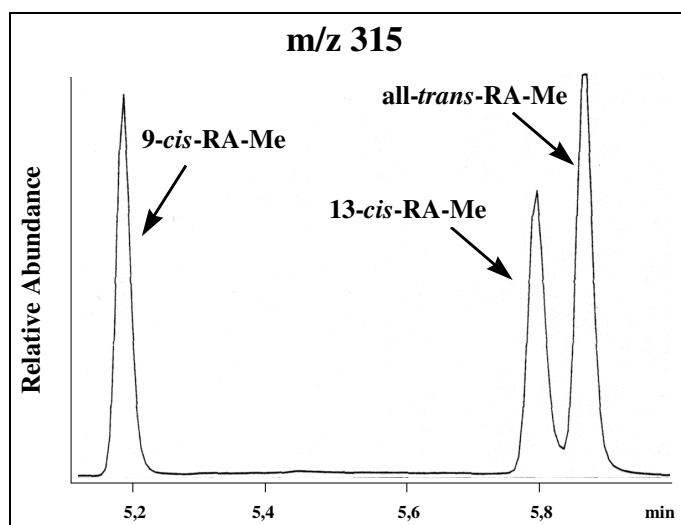


Abbildung 3.9: GC-MS-Analyse eines Standardgemisches aus Retinsäuren nach Methylierung (RA-Me = Methylretinoat). Bei dieser Methode koeluierten 9-cis-RA-Me und 9,13-di-cis-RA-Me.

#### 3.8.3 Aufnahme von UV-Spektren im HPLC-System

Zur weiteren Bestätigung der Identität möglicher Retinoid-Metabolite wurden UV-Spektren aufgenommen. Da zu Beginn dieser Arbeit kein Diodenarray-Detektor zur Verfügung stand, wurden verschiedene andere Verfahren zur Messung der Spektren angewendet. Zur Identifizierung von RA-Isomeren wurden HPLC-Fractionen entsprechender Peaks gesammelt, aufgereinigt und konzentriert. Die Aufnahme von UV-Spektren in dem für Retinsäuren wichtigen Wellenlängen-bereich von 300-370 nm erfolgte durch die sogenannte stopped-flow-Methode. Der Shimadzu SPD10AV-Detektor erlaubte die Aufnahme von Spektren direkt in der Flußzelle. Bei Erscheinen des Peaks wurden die Pumpen des HPLC-Systems gestoppt und abgewartet bis sich eine stabile Basislinie ergab. Anschließend wurde ein UV-Spektrum mit einer Scangeschwindigkeit von 5 nm/sec aufgenommen. Eine Bestätigung der Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit Spektren von Standardsubstanzen, die mit der gleichen Methodik erstellt wurden. Die Spektren wurden auf den Chromatopac CR4A Integrator übertragen, dort ausgewertet und anschließend in einem Computerprogramm (SigmaPlot) dargestellt. Die Aufnahme des UV-Spektrums für 14-HRR erfolgte durch nacheinander durchgeführte HPLC-Analysen von Proben mit gleichen Konzentrationen bei verschiedenen Wellenlängen. Die erhaltenen Flächen wurden gegen die Wellenlänge aufgezeichnet und die Datenpunkte

verbunden. Ein Vergleich erfolgte ebenfalls durch mehrfache Analysen einer Standardlösung bei denselben Wellenlängen.

#### **3.9 Bestimmung von Retinol-bindendem Protein (RBP)**

Die Bestimmung von RBP erfolgte durch Immun-Nephelometrie unter Verwendung eines Behring Nephelometers 100 und einem für diese Methode erhältlichen Kit (Behring Diagnostica, Marburg, D). Das Analysenprinzip beruhte darauf, daß RBP in einer immunchemischen Reaktion mit einem spezifischen, humanen Antikörper einen Komplex einging, so daß sich Partikel bildeten, die einen vom Medium abweichenden Brechungsindex aufwiesen. Dadurch wurde Licht, das durch das Medium gestrahlt wurde, gestreut und in seiner Intensität gemindert. In der Nephelometrie wird die Intensität des Streulichts gemessen. Für die Quantifizierung von RBP wurde eine sogenannte fixed-time Methode angewendet. 50 µl Probe (Plasma oder Urin) wurden mit 40 µl einer käuflichen Antikörperlösung (N-RBP Antiserum) und 10 µl eines Reaktionspuffers (NA-Reaktionspuffer) versetzt. Die Probe wurde anschließend mit einem Zusatzreagenz gemischt (N-Zusatzreagenz) und mit einem Puffer (N-Diluens) 1:5 verdünnt. Nach 6 min Reaktionszeit wurde die Intensität des Streulichts gemessen. Der erhaltene Wert wurde durch Abzug der Blindwertintensität, der in der gleichen Lösung sofort nach dem Mischen ermittelt wurde, korrigiert. Die Kalibrierung erfolgte durch RBP-Standards (N-Protein Standard-Serum), die in einem Konzentrationsbereich von 1-100 mg/l eingesetzt wurden. Die Messungen wurden am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie des Universitätsklinikums Steglitz unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Fitzner durchgeführt.

#### **3.10 Berechnung pharmakokinetischer Parameter**

Maximale Konzentrationen ( $C_{\max}$ ) der Retinoide und die entsprechenden Zeitpunkte für das Auftreten der  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) stellten die in den Zeitintervallen der Probenahme beobachteten Werte dar. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the concentration-time curve*, AUC) wurde für den Zeitraum der Probenahme durch Anwendung der linearen Trapezregel berechnet (Rowland und Tozer 1989).

#### **3.11 Statistische Auswertung**

Die angegebenen Konzentrationen stellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $m \pm SD$ ) mit der jeweils angegeben Probenanzahl dar. Gleiches galt für den Zeitpunkt für  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) sowie für AUC-Werte. Statistische Analysen für den Vergleich zweier Mittelwerte erfolgten durch Student's t-test. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wahrscheinlichkeitswert  $P < 0,05$  angenommen. Das Überprüfen auf Ausreißer erfolgte durch T-Prozedur (Bolton 1984). Die Ergebnisse der Teratogenitäts-Untersuchungen nach Gabe von RA/ROH mit PA/POH wurden mit der entsprechenden Gruppe, die nur mit RA oder ROH behandelt wurden, mittels ungepaartem Student's t-test (für Fetengewichte) oder Fisher's Exact Test (für Mißbildungen) verglichen.

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Metabolismus von Vitamin A nach dem Verzehr einer Lebermahlzeit

##### 4.1.1 Bestimmung des Vitamin-A-Gehaltes der Lebermahlzeit

Die in den Leberproben ermittelten Konzentrationen an Retinol und verschiedenen Retinylestern wurden mittels HPLC-Methode IV in Verbindung mit Probenaufbereitung C bestimmt und sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Ein repräsentatives Chromatogramm einer Leberprobe ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1; Peak 4) waren die hauptsächlich vorkommenden Ester, gefolgt von Retinylstearat (18:0; Peak 5) und -linoleat (18:2; Peak 3). Die Proben enthielten nur geringe Mengen an Retinylmyristat (14:0; Peak 2).

Das Verteilungsmuster der Retinylester war in roher und gebratener Leber vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurden in der Rohleber zwar beträchtliche Mengen an freiem Retinol gefunden ( $8,3 \pm 2,5$  % des gesamten Vitamin-A-Gehaltes), diese konnten in der gebratenen Leber jedoch kaum mehr nachgewiesen werden ( $0,4 \pm 0,4$  %).

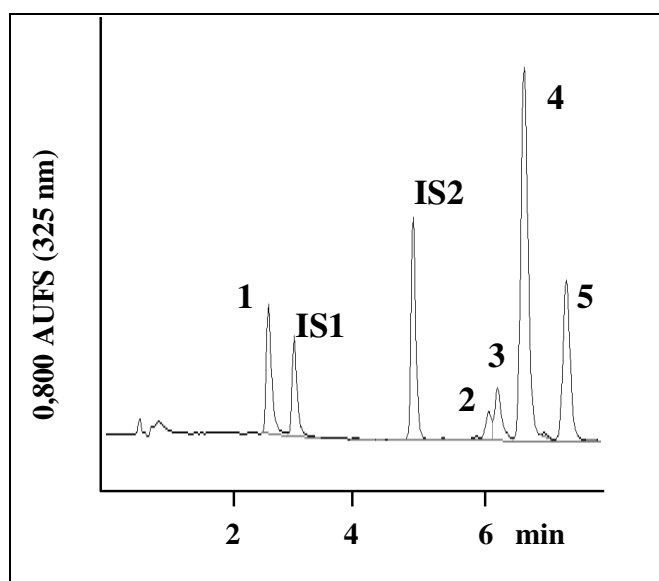


Abbildung 4.1: Bestimmung von Retinol und Retinylestern in einer Putenleberprobe (roh) mittels HPLC-Methode IV/ Probenaufbereitung C. 1: Retinol, 2: Retinylmyristat (14:0), 3: Retinyl linoleat (18:2), 4: Retinyl palmitat/-oleat (16:0/18:1), 5: Retinyl stearat (18:0), IS1: Interner Standard Etretinol, IS2: Interner Standard Retinylnonanoat (9:0).

Der Gesamtgehalt an Vitamin A (berechnet als Retinol) betrug  $0,48 \pm 0,08$  mg/g Rohleber und  $0,55 \pm 0,14$  mg/g gebratener Leber. Der Gesamtgehalt in der gebratenen Leber bezogen auf das Rohgewicht (unter Berücksichtigung des Wasserverlusts) war mit  $0,49 \pm 0,11$  mg/g Leber fast vergleichbar mit dem Gehalt in der Rohleber, obwohl durch den Bratprozeß nachweislich freies

## 4 - Ergebnisse

Retinol abgebaut wurde. Dieses Phänomen mag durch eine effektivere Probenvorbereitung und Extraktion von bereits gebratener Leber gegenüber roher Leber zurückzuführen sein.

Die Hydrolyse der Retinylester in den Leberproben (Probenaufbereitung D) und anschließende Analyse der Leberproben auf geometrische Isomere des Retinols mittels HPLC-Methode V ergab, daß all-*trans*-Retinol das Hauptisomer war, gefolgt von geringen Mengen 13-*cis*-Retinol und Spuren von 9-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Retinol. Nur 4-8% der all-*trans*-Isomere des Retinols bzw. der Retinylester isomerisierten während des Bratprozesses zu den entsprechenden 13-*cis*-Isomeren, wohingegen der Anteil an 9-*cis*- und 9,13-di-*cis*-Isomeren unverändert blieb.

Retinol und Retinylester (als Retinol berechnet)	Rohleber	Gebratene Leber
	%	%
Retinol	8,3 ± 2,5	0,4 ± 0,4
Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1)	55,8 ± 2,2	63,1 ± 1,1
Retinylstearat (18:0)	23,7 ± 0,8	22,8 ± 1,6
Retinyllinoleat (18:2)	11,5 ± 0,4	12,7 ± 1,0
Retinylmyristat (14:0)	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Gesamt-Vitamin A (als Retinol)</b>	0,48 ± 0,08 mg/ g	0,55 ± 0,14 mg/ g
<b>Gesamt-Vitamin A</b> (Wasserverlust berücksichtigt)		<b>0,49 ± 0,11 mg/ g</b>
Retinol-Isomere nach Hydrolyse der Ester	Rohleber	Gebratene Leber
	%	%
All- <i>trans</i> -	87,1 ± 1,9	80,8 ± 2,3
13- <i>cis</i> -	8,4 ± 2,0	14,6 ± 1,9
9- <i>cis</i> -	3,7 ± 1,0	3,6 ± 0,8
9,13-di- <i>cis</i> -	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2

Tabelle 4.1: Vitamin-A-Gehalte in den Leberproben (n=10).

## 4 - Ergebnisse

Unter Berücksichtigung der standardisierten Leberportionen (2 g Rohgewicht/kg KG) konnte die Vitamin-A-Aufnahme auf ca.  $3233 \pm 740$  IU/ kg KG geschätzt werden. Der Durchschnittsproband in dieser Studie (82 kg KG) nahm mit dieser Mahlzeit eine Menge von  $265.000 \pm 61.000$  IU Vitamin A (=  $79,5 \pm 18,3$  mg Retinol) auf.

### 4.1.2 Identifizierung neuer Vitamin-A-Metaboliten in Humanplasma

Die im Rahmen dieser Studie gesammelten Plasmaproben wurden mit drei verschiedenen HPLC-Methoden analysiert. Unpolare Metaboliten (Retinol und Retinylester) wurden mittels HPLC-Methode II / Probenaufbereitung A, polare Metaboliten (14-HRR und RA-Isomere außer 9,13-di-*cis*-RA) mittels HPLC-Methode I / Probenaufbereitung B und 9,13-di-*cis*-RA mittels HPLC-Methode III / Probenaufbereitung B bestimmt. In Abbildung 4.2 ist ein repräsentatives Chromatogramm einer Plasmaprobe dargestellt, die 4 h nach der Einnahme der Lebermahlzeit gesammelt und mittels HPLC-Methode II analysiert wurde. Aufgrund der Koelution mit Standard-Retinoiden und des charakteristischen Flächenverhältnisses bei den zwei Detektionswellenlängen konnten die bereits bekannten Metaboliten *all-trans*-4-oxo-RA (1), 13-*cis*-4-oxo-RA (2), 13-*cis*-RA (3) und *all-trans*-RA (4) identifiziert werden. Zusätzlich eluierte Peak X zwischen *all-trans*- und 13-*cis*-RA und Peak Y ca. 0,35 min. nach *all-trans*-RA.

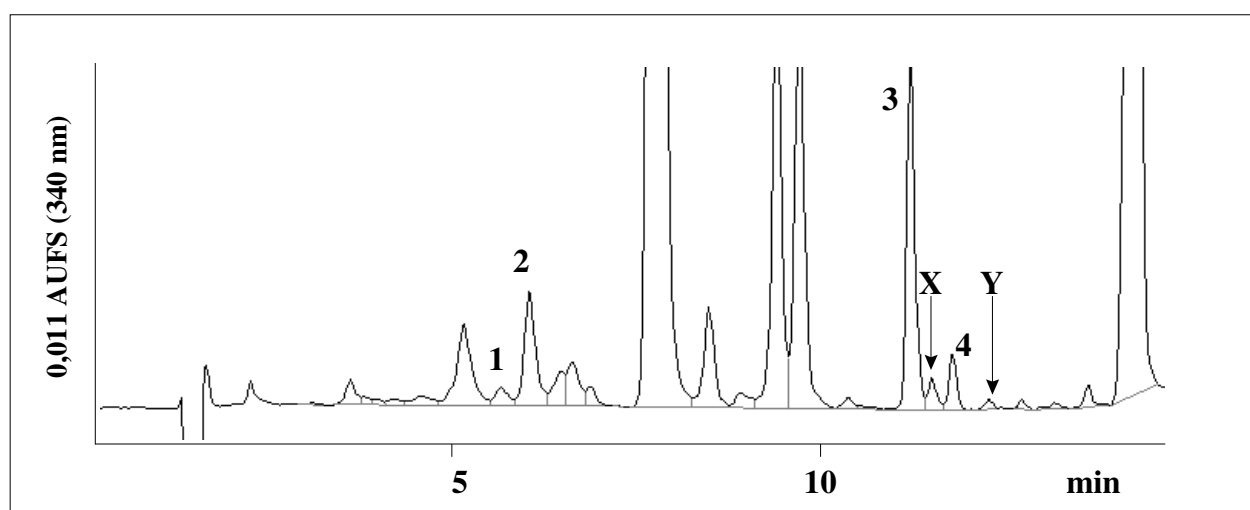


Abbildung 4.2: HPLC-Chromatogramm einer Plasmaprobe (4h nach Leberverzehr) analysiert mittels HPLC-Methode I / Probenaufbereitung B

## 4 - Ergebnisse

Peak X koeluierte mit der 9-*cis*-RA-Standardsubstanz und wies eine gute Übereinstimmung mit dem UV-Spektrum des Standards auf (s. Abbildung 4.4).

Gesammelte Eluate des mutmaßlichen 9-*cis*-RA-Peaks wurden nach Derivatisierung zum Methylester mittels GC/MS analysiert. Abbildung 4.3 zeigt das entsprechende Chromatogramm der Probe bei  $m/z = 315$  ( $[M+H]^+$ ). Der methylierte Peak X zeigte Koelution mit dem Methylester von 9-*cis*-RA.

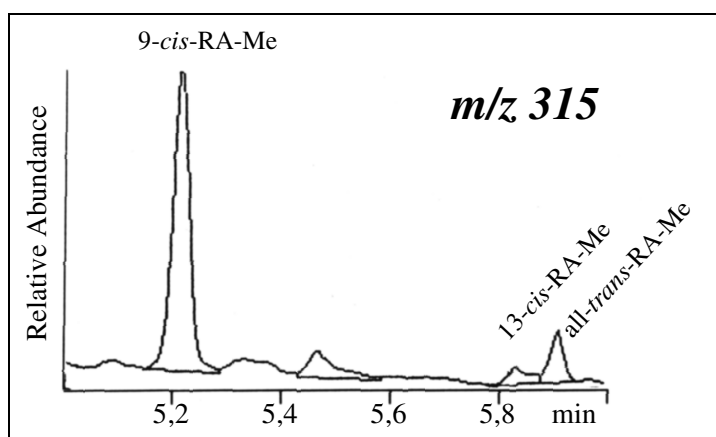


Abbildung 4.3: GC/MS-Chromatogramm des methylierten Peak X bei  $m/z$  315. Eine geringe Isomerisierung von 9-*cis*-RA-Me trat während der Probenaufbereitung auf.

Peak Y koeluierte mit einem 14-HRR-Standard. Außerdem zeigte das Spektrum dieser Substanz eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzsubstanz (Abbildung 4.4). Charakteristisch für die *retro*-Retinoide ist hierbei die vibronische Struktur des Spektrums (Buck et al. 1991).

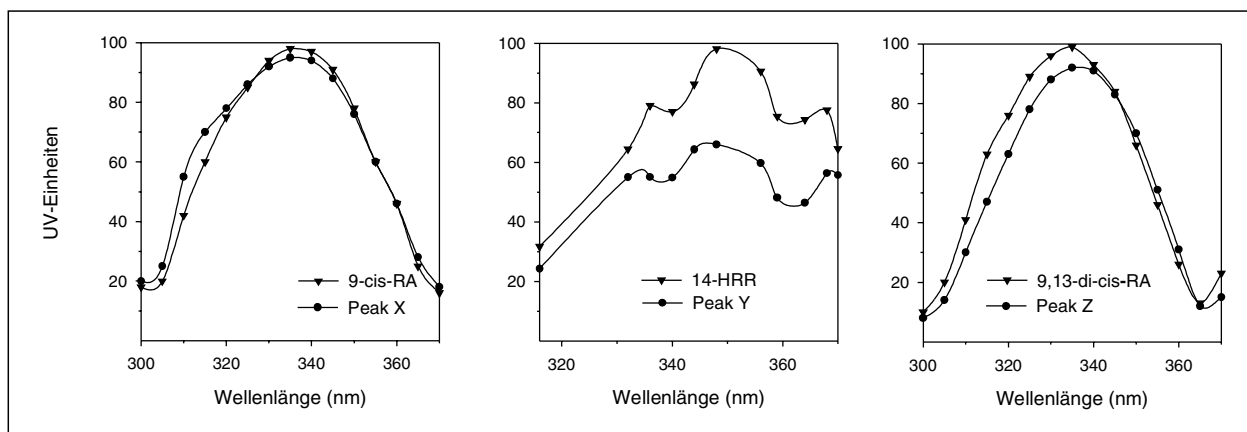


Abbildung 4.4: UV-Spektren der neu identifizierten Metaboliten im Vergleich mit Referenzsubstanzen.



## 4 - Ergebnisse

Eine humane Plasmaprobe (4 h), die mittels HPLC-Methode III analysiert wurde, ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Anwendung dieser Methode zeigte, daß nach Einnahme der Lebermahlzeit noch ein zusätzliches Signal (Peak Z) im Plasma auftauchte, das zwischen 13-*cis*- und 9-*cis*-RA eluierte.

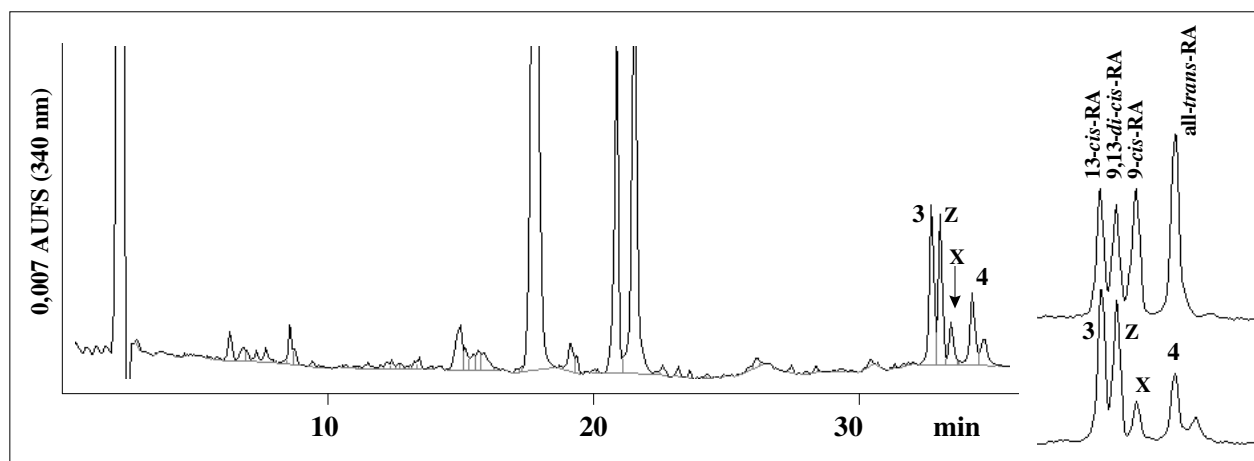


Abbildung 4.5: HPLC-Chromatogramm einer Plasmaprobe (4h nach Leberverzehr) analysiert mittels HPLC-Methode III / Probenaufbereitung B.

Der unbekannte Peak koeluierte mit 9,13-*di-cis*-RA. Auch hier zeigten die UV-Spektren eine gute Übereinstimmung (Abbildung 4.4). Gesammelte Peakeluate wurden nach Methylierung ebenfalls mittels GC/MS analysiert. Abbildung 4.6 zeigt das Chromatogramm bei  $m/z = 315$  ( $[M+H]^+$ ). Der methylierte Peak Z koeluierte mit dem Methylester von 9,13-*di-cis*-RA.

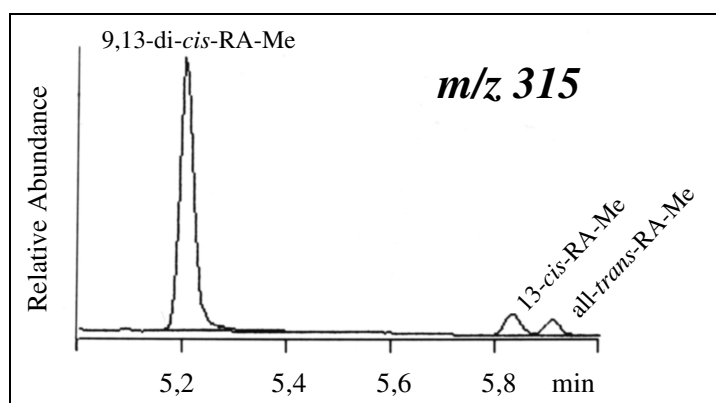


Abbildung 4.6: GC/MS-Chromatogramm des methylierten Peak Z bei  $m/z$  315. Eine geringe Isomerisierung von 9,13-*di-cis*-RA-Me trat während der Probenaufbereitung auf.

## 4 - Ergebnisse

---

Die Retinsäure-Isomere 9-*cis*-RA und 9,13-di-*cis*-RA sowie das *retro*-Retinoid 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR) konnten somit erstmals im Menschen als Plasma-Metaboliten nach Aufnahme hoher Vitamin-A-Mengen durch Verzehr von Leber identifiziert werden.

### 4.1.3 Endogene Retinoid-Konzentrationen in Humanplasma

Vor Verabreichung der Mahlzeit analysierte Plasmaproben (s. Tabelle 4.2) enthielten quantifizierbare Mengen an Retinol ( $641 \pm 99$  ng/ml), Retinylpalmitat/-oleat ( $32,2 \pm 19,1$  ng/ml) sowie die polaren Metaboliten 13-*cis*-4-oxo-RA ( $2,4 \pm 0,6$  ng/ml), 13-*cis*-RA ( $1,1 \pm 0,2$  ng/ml) und all-*trans*-RA ( $0,8 \pm 0,2$  ng/ml). Diese Ergebnisse waren mit denen früher bereits beschriebener endogener Retinoidspiegel in Humanplasma vergleichbar (Eckhoff and Nau 1990; Tang and Russell 1990; Buss et al. 1994; Sass et al. 1995; Eckhoff and Nau 1990). Weder 9-*cis*- noch 9,13-di-*cis*-RA waren in diesen Proben detektierbar. Sehr kleine Peaks, die mit authentischer 14-HRR bzw. all-*trans*-4-oxo-RA koeluierten, wurden in drei Proben gefunden. Die Identität dieser Peaks konnte jedoch nicht durch zusätzliche Methoden (z.B. GC/MS) bestätigt werden, da die Konzentrationen zu gering waren.

### 4.1.4 Plasmakinetik von Retinol und Retinylestern

Die in den größten Konzentrationen vorkommenden Retinylester im Plasma waren Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1). Ihre Plasmakonzentrationen stiegen innerhalb von 4 h bis zu 100-fach über endogene Werte an (siehe Abbildung 4.7). Anschließend konnte ein langsamer Abfall der Konzentrationen beobachtet werden, so daß die Plasmaspiegel auch nach 24 h noch 6-fach über endogene Konzentrationen erhöht waren. Retinylinoleat (18:2) und -stearat (18:0) waren vor Verabreichung der Mahlzeit nicht detektierbar, traten aber bereits nach 1 h auf. Diese Retinylester wiesen einen ähnlichen kinetischen Verlauf wie Retinylpalmitat/-oleat. Ein Vergleich der  $C_{\max}$ - und der  $AUC_{0-24h}$ -Werte zeigte, daß Retinylpalmitat/-oleat einen Anteil von ca. 65% am gesamten Retinylesterpool im Plasma hatte, wohingegen Retinylstearat und -linoleat nur zu 27-29% bzw. 6-8% beitrugen.

Plasmakonzentrationen von Retinol stiegen nach 2 h nur sehr langsam über Basislinienwerte an, blieben dann aber über den gesamten Zeitraum leicht erhöht (siehe Abbildung 4.7). Der Anstieg gegenüber den endogenen Werten war zwischen 4 h und 10 h statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ; Student's t-test für Wertepaare).

## 4 - Ergebnisse

Die Analysen ausgewählter Plasmaproben (0 h- und 4 h-Proben) auf Retinol-Isomere vor und nach Hydrolyse der Retinylester im Plasma zeigten, daß im Plasma nur die all-*trans*-Form von Retinol vorlag.

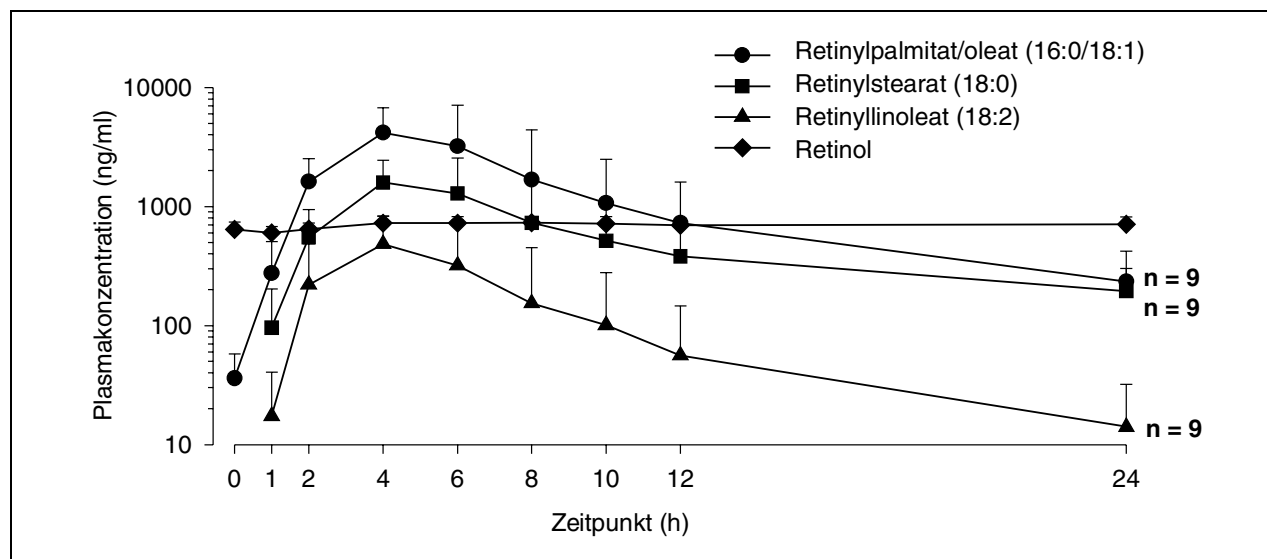


Abbildung 4.7: Plasmakinetik von Retinol (n=10) und Retinylestern (n=9) nach Leberverzehr.

### 4.1.5 Plasmakinetik polarer Retinoid-Metaboliten

Die Hauptmetaboliten des oxidativen Metabolismus von Vitamin A waren 13-*cis*-RA und dessen Phase-I-Metabolit 13-*cis*-4-oxo-RA. Ihre  $C_{\max}$ -Werte waren 20- bzw. 14-fach über endogene Werte erhöht. 13-*cis*-RA erreichte seine  $T_{\max}$  bei  $3,8 \pm 0,6$  h und wurde langsam eliminiert, so daß auch nach 24 h immer noch 4-fach über endogene Werte liegende Konzentrationen auftraten. Im Gegensatz dazu stiegen die Plasmaspiegel von 13-*cis*-4-oxo-RA sehr langsam an ( $T_{\max}$   $10,6 \pm 1,3$  h), waren aber nach 24 h nur noch 1,5- bis 2-fach erhöht (s. Abbildung 4.8).

Die Kinetik von all-*trans*-RA zeigte einen ganz anderen Verlauf als die der übrigen RA-Isomere. Die Plasmakonzentrationen stiegen sehr schnell innerhalb von 2 h auf ein 2-faches an und fielen dann auf Plasmaspiegel ab, die unter den endogenen Werten lagen. Die Plasmaspiegel nach 12 h waren signifikant geringer als endogene Konzentrationen ( $P < 0,01$ ; Student's t-test), nach 24 h waren dann wieder endogene Werte erreicht. Bemerkenswerterweise war die  $T_{\max}$  von all-*trans*-RA signifikant kürzer als die der Vorläufersubstanzen Retinylpalmitat/-oleat ( $P < 0,01$ ; Student's t-test), wohingegen die  $T_{\max}$  der anderen RA-Isomere gleich lang oder länger war.

## 4 - Ergebnisse

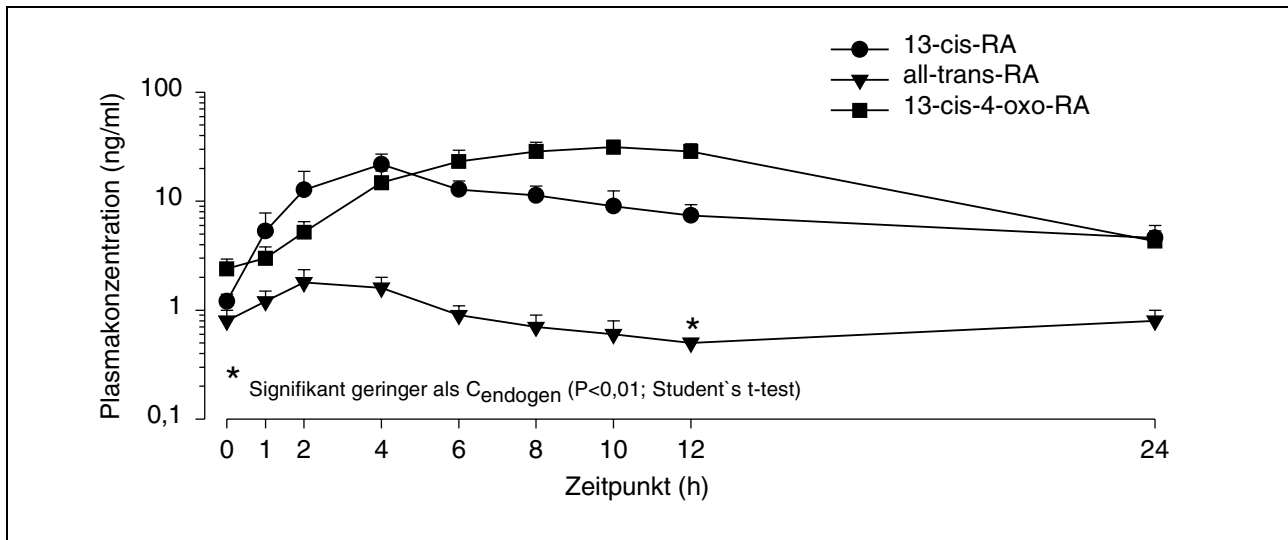


Abbildung 4.8: Plasmakinetik der polaren Vitamin-A-Metaboliten nach Leberverzehr.

Von den neu identifizierten Retinoid-Metaboliten (s. Abbildung 4.9) trat 9,13-di-*cis*-RA in hohen Mengen bereits nach 1 h auf, erreichte das Maximum zwischen 2 und 4 h und wurde dann sehr schnell eliminiert.

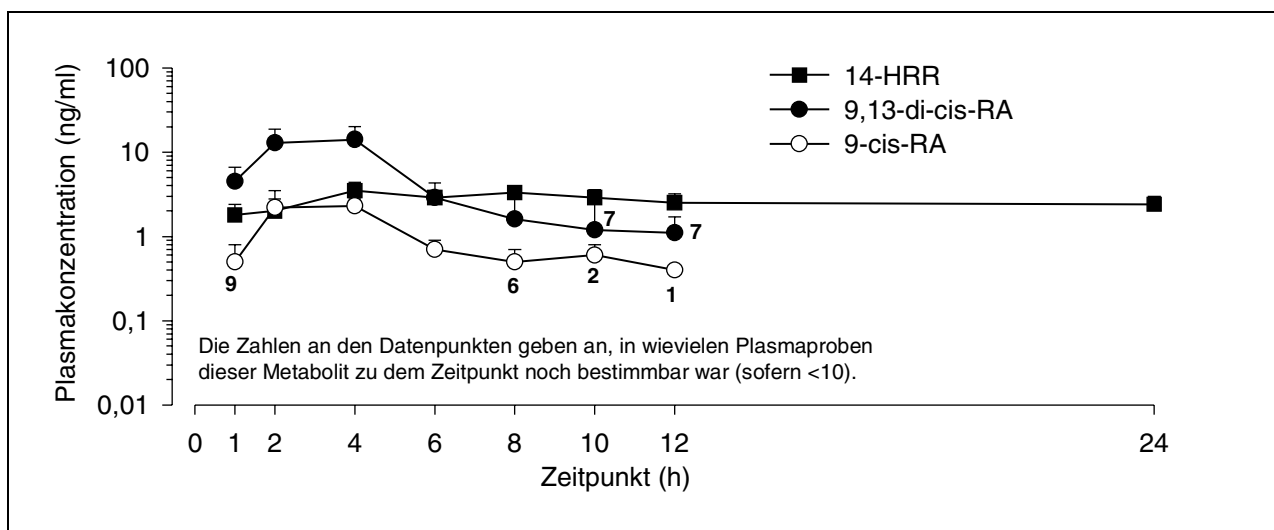


Abbildung 4.9: Plasmakinetik der neu identifizierten Vitamin-A-Metaboliten.

Nach 24 h war dieser Metabolit in keiner Plasmaprobe mehr nachweisbar, in Proben von 3 Probanden sogar schon nach 10 h. 9-*cis*-RA zeigte eine ähnliche Kinetik, wenn auch bei geringeren Konzentrationen. 14-HRR erreichte nach 4 h das Maximum, die Plasmakonzentrationen blieben danach über die gesamten 24 h meßbar.

Retinoid	C <sub>endogen</sub> ng/ml	Nach Leberverzehr			
		C <sub>max</sub> ng/ml	T <sub>max</sub> h	AUC <sub>0-24h</sub> ng·h/ml	ΔAUC <sub>0-24h</sub> <sup>a</sup> ng·h/ml
Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1) <sup>b</sup>	32,2 ± 19,1	3540 ± 1736*	4,0 ± 0,0	22085 ± 7376	21311 ± 7371
Retinylstearat (18:0) <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	1457 ± 710	4,4 ± 0,9	10047 ± 3689	10047 ± 3689
Retinyl linoleat (18:2) <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	464 ± 262	3,8 ± 0,7	1976 ± 791	1976 ± 791
Retinol	641 ± 99	800 ± 105*	12,2 ± 8,4	16822 ± 1982	1436 ± 1543
14-HRR	<sup>d</sup>	3,7 ± 0,9	5,4 ± 1,9	61,7 ± 9,0	61,7 ± 9,0
All- <i>trans</i> -RA	0,8 ± 0,2	2,0 ± 0,5*	2,6 ± 1,0	19,7 ± 1,7	1,25 ± 4,70
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	<sup>d</sup>	0,8 ± 0,2	9,6 ± 5,8	14,7 ± 6,4	14,7 ± 6,4
13- <i>cis</i> -RA	1,1 ± 0,2	21,5 ± 4,3*	3,8 ± 0,6	204 ± 35,3	178,3 ± 33,5
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	2,4 ± 0,6	32,1 ± 4,9*	10,6 ± 1,3	435 ± 68,5	379,2 ± 63,0
9- <i>cis</i> -RA	n.d. <sup>c</sup>	2,7 ± 1,1	3,4 ± 1,0	10,7 ± 3,4	10,7 ± 3,4
9,13-di- <i>cis</i> -RA	n.d. <sup>c</sup>	17,1 ± 5,8	3,2 ± 1,0	68,2 ± 21,6	68,2 ± 21,6

<sup>a</sup> Berechnet durch Subtraktion endogener Spiegel über 24 h ( $\Delta AUC = AUC_{0-24h} - [C_{endogen} * 24h]$ ).

<sup>b</sup> Ein Proband hatte sehr hohe Retinylester-Konzentrationen (C<sub>max</sub> 14106 ng/ml für Retinylpalmitat/-oleat, 4761 ng/ml für Retinylstearat und 1581 ng/ml für Retinyl linoleat). AUC- und C<sub>max</sub>-Werte wurden als Ausreißer befunden (bestimmt durch T-Prozedur), daher wurden die Daten für Retinylester mit n=9 berechnet.

<sup>c</sup> Nicht detektierbar; Nachweisgrenzen: 5 ng/ml für Retinylester, 0,3 ng/ml (für 9-*cis*-RA) und 0,5 ng/ml (für 9,13-di-*cis*-RA).

<sup>d</sup> Endogen nur in drei Proben bestimmbar; 1,3 ± 0,2 ng/ml (für 14-HRR) und 0,6 ± 0,3 ng/mL (für all-*trans*-4-oxo-RA).

\* Signifikant höher als C<sub>endogen</sub> (P<0.001, Student's *t*-test für gepaarte Daten).

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der kinetischen Daten von Vitamin-A-Metaboliten in Humanplasma vor und nach dem Verzehr einer Lebermahlzeit (Werte stellen Mittelwerte ± Standardabweichung mit n=10 dar).

## 4 - Ergebnisse

### 4.1.6 Retinol-bindendes Protein (RBP) und molares Verhältnis Retinol/RBP

Die endogenen RBP-Konzentrationen betrugen  $2,3 \pm 0,4$  nmol/ml, bewegten sich innerhalb der ersten 8 h nach Einnahme der Mahlzeit in diesem Konzentrationsbereich, zeigten danach aber sehr große Schwankungen. Das Verhältnis RBP/Retinol war zu Beginn  $1,0 \pm 0,1$  und stieg dann leicht an (s. Abb. 4.10). Ein signifikanter Anstieg des Verhältnisses, der auf einen Überschuß an nicht gebundenem Retinol hindeutete, ergab sich nur nach 10 h und nach 24 h ( $P < 0,01$ ; Student's t-test), vermutlich aufgrund der zu diesen Zeitpunkten sehr niedrigen RBP-Spiegel.

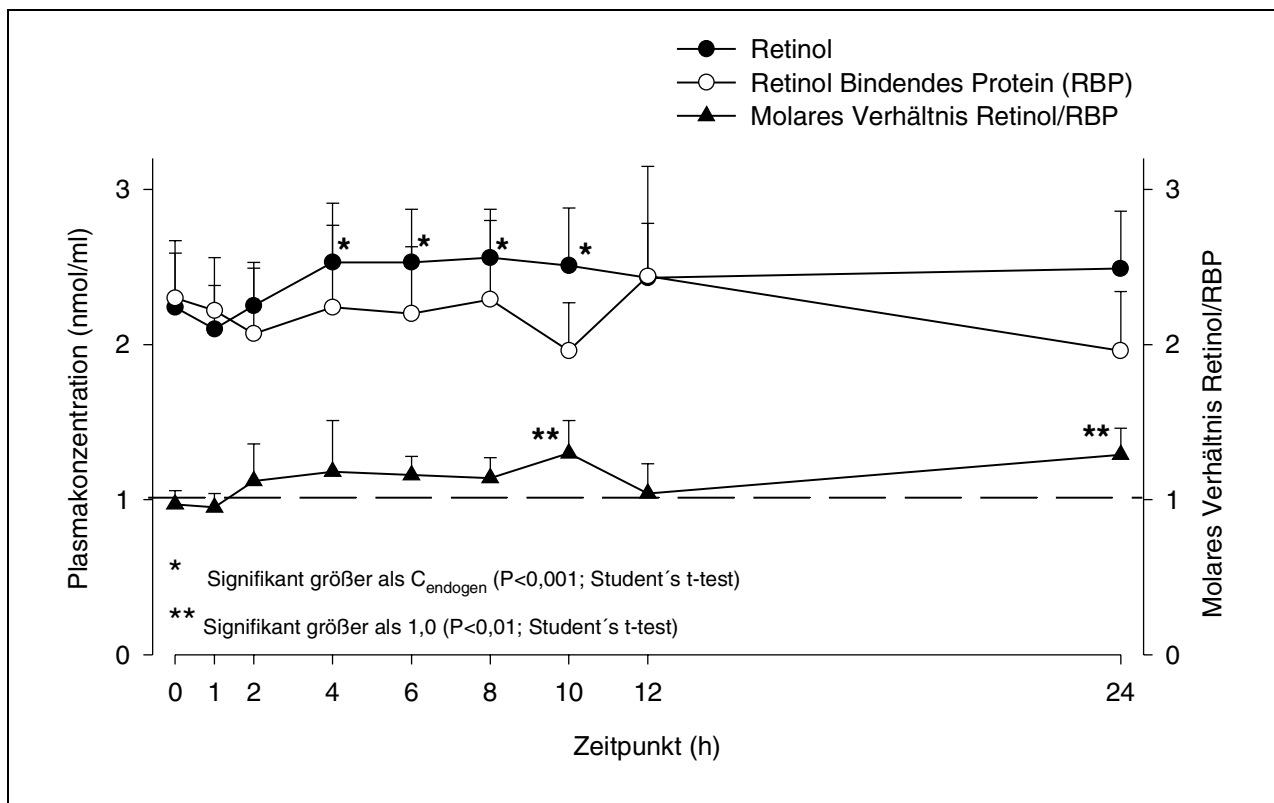


Abbildung 4.10: Plasmakinetik von Retinol und RBP sowie molares Verhältnis Retinol/RBP.

### 4.1.7 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zum Metabolismus von Vitamin A beim Menschen nach Verzehr einer Lebermahlzeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die durchschnittliche Vitamin-A-Aufnahme nach dem Verzehr einer standardisierten Mahlzeit aus Putenleber betrug  $0,98 \pm 0,22$  mg Retinol/kg KG.
- 9-*cis*-RA, 9,13-di-*cis*-RA und 14-HRR konnten erstmals beim Menschen als Vitamin-A-Metaboliten identifiziert werden.
- Nach Leberverzehr waren die Plasmaspiegel der Retinylester mehr als 100-fach erhöht und lagen auch nach 24 h noch deutlich über den endogenen Werten.
- Die homöostatisch kontrollierten Retinolspiegel stiegen nach Leberverzehr nur geringfügig, aber signifikant über endogene Werte an. Dabei war das molare Konzentrationsverhältnis von Retinol zu seinem spezifischen Plasmaprotein RBP zu einigen Zeitpunkten deutlich größer als 1, was auf das Vorhandensein ungebundenen Retinols in der Blutzirkulation hindeutet.
- Der Metabolismus von Vitamin A zu polareren Metaboliten führte zur Bildung einer Vielzahl von RA-Isomeren. Gemessen am AUC-Wert konnte folgende Reihenfolge festgestellt werden: 13-*cis*-4-oxo-RA > 13-*cis*-RA > 9,13-di-*cis*-RA > all-*trans*-RA > all-*trans*-4-oxo-RA > 9-*cis*-RA.
- Die Plasmakinetik von all-*trans*-RA unterschied sich deutlich von der anderer RA-Isomere. Maximale Konzentrationen traten schon nach 2 h auf, die Plasmakonzentrationen sanken dann auf Werte unterhalb endogener Spiegel bevor sie nach 24 h wieder endogene Werte erreichten.

### 4.2 Vergleich der Metabolitenmuster nach Supplementation bzw. Lebermahlzeit

Frühere Arbeiten haben bereits aufgezeigt, daß nach Gabe von Vitamin A als Supplementation bzw. Lebermahlzeit große Unterschiede in Bezug auf die Plasmakinetik der Retinoid-Metaboliten zu erwarten sind (Eckhoff and Nau 1990; Buss et al. 1994; Arnhold et al. 1996). In einer Humanstudie wurde zu dieser Thematik ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde neun weiblichen Probanden in einem Abstand von vier Wochen 15 mg bzw. 50 mg Vitamin A als Supplement oder 50 mg Vitamin A als Lebermahlzeit (jeweils berechnet als Retinol) verabreicht. Vor der Gabe wurden Blutproben abgenommen, um den endogenen Retinoid-Status zu

## 4 - Ergebnisse

---

bestimmen. Zu dem Zeitpunkt, an dem die maximalen Konzentration aller RA-Isomere im Plasma zu erwarten waren (2 h nach Supplementation, 4 h nach Lebermahlzeit) wurde den Probanden erneut Blut abgenommen. Daraus gewonnenes Plasma wurde auf Retinoide analysiert. In Tabelle 4.3 sind die Plasmakonzentrationen der detektierten Retinoide zusammengefaßt. Vor Verabreichung von Vitamin A konnten Retinol sowie geringe Konzentrationen Retinylpalmitat/-oleat und die Retinsäuren *all-trans*-RA, *13-cis*-RA und *13-cis*-4-oxo-RA detektiert werden.

Ein signifikanter Anstieg der homöostatisch kontrollierten Retinolspiegel im Plasma über endogene Werte war nur nach Gabe des 50 mg-Supplements feststellbar ( $P < 0,01$ ; Student's t-test für gepaarte Daten). Weiterhin war auffällig, daß 4 h nach Leberverzehr ca. 10-fach höhere Retinylpalmitat/-oleat-Konzentrationen (16:0/18:1) auftraten als 2 h nach der Supplementation. Die Retinylester Retinylstearat (18:0) und -linoleat (18:2) waren im Plasma nur nach Lebergabe detektierbar, nicht jedoch nach Supplementation. Die Plasmakonzentrationen der polaren Retinoid-Metaboliten wiesen sehr große Unterschiede auf. *All-trans*-RA stieg nach Lebergabe nur sehr geringfügig, aber dennoch signifikant ( $P < 0,001$ ; Student's t-test für gepaarte Daten) über endogene Werte an. Nach Supplementation mit 50 mg Vitamin A war der Anstieg von *all-trans*-RA hingegen sehr deutlich. Die Gabe des 15 mg-Supplements ließ die Plasmaspiegel von *all-trans*-RA zwar ansteigen, die Zunahme korrelierte jedoch nicht mit der Dosisveränderung, sondern war im Vergleich zu den Plasmaspiegeln nach Gabe des 50 mg-Supplements wesentlich geringer. Die Plasmakonzentrationen von *13-cis*-, 9,13-di-*cis*- und *13-cis*-4-oxo-RA waren nach Leberverzehr und nach Verabreichung des 15 mg-Supplements ungefähr vergleichbar, nach Gabe des 50 mg-Supplements jedoch wesentlich höher. *All-trans*-4-oxo-RA konnte nach Leberverzehr nicht detektiert werden. Dieser Phase-I-Metabolit von *all-trans*-RA war nach Gabe des 15 mg-Supplements nur in fünf Proben detektierbar, trat aber nach Verabreichung des 50 mg-Supplements in vergleichbaren Konzentrationen auf wie *13-cis*-4-oxo-RA.



## 4 - Ergebnisse

<b>Retinoid</b>	<b>C<sub>endogen</sub> (ng/ml)</b>		
	<b>vor Leberverzehr (50 mg)</b>	<b>vor Supplement (50 mg)</b>	<b>vor Supplement (15 mg)</b>
Retinol	609,1 ± 224,0	580,7 ± 203,8	605,2 ± 257,4
Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1)	18,1 ± 8,9	15,5 ± 10,0	11,4 ± 6,3
All-trans-RA	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1
13-cis-RA	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,5
13-cis-4-oxo-RA	2,9 ± 1,0	3,0 ± 1,1	3,4 ± 1,4
<b>Retinoid</b>	<b>C<sub>2h/4h</sub> (ng/ml)</b>		
	<b>nach Leberverzehr (4h)</b>	<b>nach Supplement (2h)</b>	<b>nach Supplement (2h)</b>
Retinol	620,3 ± 222,8	698,4 ± 179,5	595,9 ± 259,5
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	1899 ± 726	160,6 ± 141,2	141,1 ± 127,6
Retinylstearat (18:0)	736,2 ± 252,2	n.d.	n.d.
Retinylilinoleat (18:2)	170,9 ± 59,4	n.d.	n.d.
All-trans-RA	2,2 ± 0,7	51,5 ± 22,3	5,3 ± 4,8
13-cis-RA	7,4 ± 4,2	31,2 ± 12,1	6,6 ± 2,2
9-cis-RA	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,4	n.d.
9,13-di-cis-RA	5,3 ± 3,1	18,5 ± 3,5	5,4 ± 1,2
All-trans-4-oxo-RA	n.d.	4,0 ± 2,2	0,7 ± 0,3 <sup>n=5</sup>
13-cis-4-oxo-RA	3,1 ± 1,6	5,9 ± 1,8	2,2 ± 0,4

Tabelle 4.3: Retinoid-Konzentrationen in humanem Plasma (n=9) vor (=C<sub>endogen</sub>) und 2 h nach Verabreichung eines Supplements (15 mg bzw. 50 mg Vitamin A) bzw. 4 h nach Gabe einer Lebermahlzeit (50 mg Vitamin A).

In Abbildung 4.11 ist der Unterschied in Bezug auf das Retinoid-Muster in Humanplasma nach Gabe von Vitamin A als Leber oder Supplement dargestellt und kann wie folgt zusammengefaßt werden:

## 4 - Ergebnisse

- Nach Vitamin-A-Gabe als Supplement oder Leber zeigte sich zu den gewählten Zeitpunkten ein marginaler Einfluß auf die Retinolspiegel, der nur nach Gabe des 50 mg-Supplements signifikant war.
- 4 h nach Einnahme der Lebermahlzeit traten sehr hohe Plasmaspiegel an Retinylestern auf. Solch hohe Retinylester-Konzentrationen waren 2 h nach Gabe des Supplements noch nicht erreicht.
- 2 h nach Gabe des 50 mg-Supplements traten im Vergleich zur 4 h-Probe nach Lebergabe sehr hohe Plasmaspiegel an Retinsäuren (insbesondere *all-trans*-RA) auf, obwohl die Plasmaspiegel der Vorläufersubstanzen Retinylpalmitat/-oleat wesentlich geringer waren.

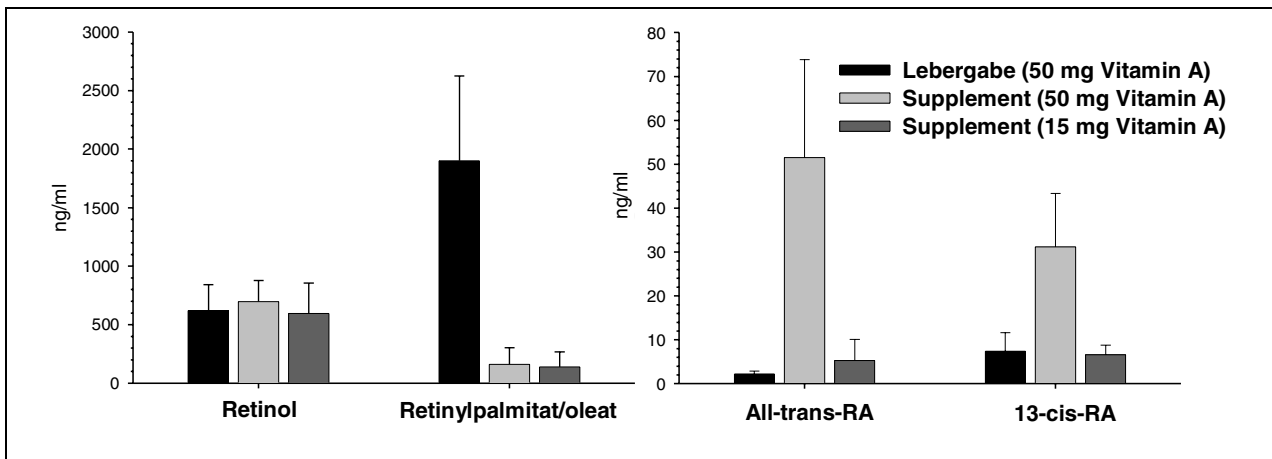


Abbildung 4.11: Konzentrationen von Retinoiden in Humanplasma (n=9) 2 h nach Verabreichung eines Supplements bzw. 4 h nach Gabe von Vitamin A als Lebermahlzeit

### 4.3 Intestinaler Metabolismus von Vitamin A

#### 4.3.1 *In vitro*-Metabolismus durch cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms

Die Umsetzung von Retinol zu all-*trans*-RA erfolgt in zwei Stufen, wobei Retinol zunächst zum Retinaldehyd und anschließend weiter zu all-*trans*-RA oxidiert wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Zweistufenreaktion ist dabei die reversible Umsetzung des Alkohols zum Aldehyd. Um die mögliche Beteiligung löslicher Enzyme des Intestinaltraktes (insbesondere Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen) am Metabolismus hochdosierter Mengen Vitamin A (Retinol) zu überprüfen, wurde zunächst ein *in vitro*-Versuch durchgeführt. Cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms (s. 3.4.1) wurden mit Retinol in Substratkonzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 750  $\mu\text{M}$  inkubiert.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von Isopropanol gestoppt, die Proben wurden anschließend mittels HPLC-Methode II / Probenaufbereitung A (gegebenenfalls nach Verdünnung) analysiert. Das Intermediat Retinaldehyd war nur in Spuren detektierbar und konnte nicht quantifiziert werden.

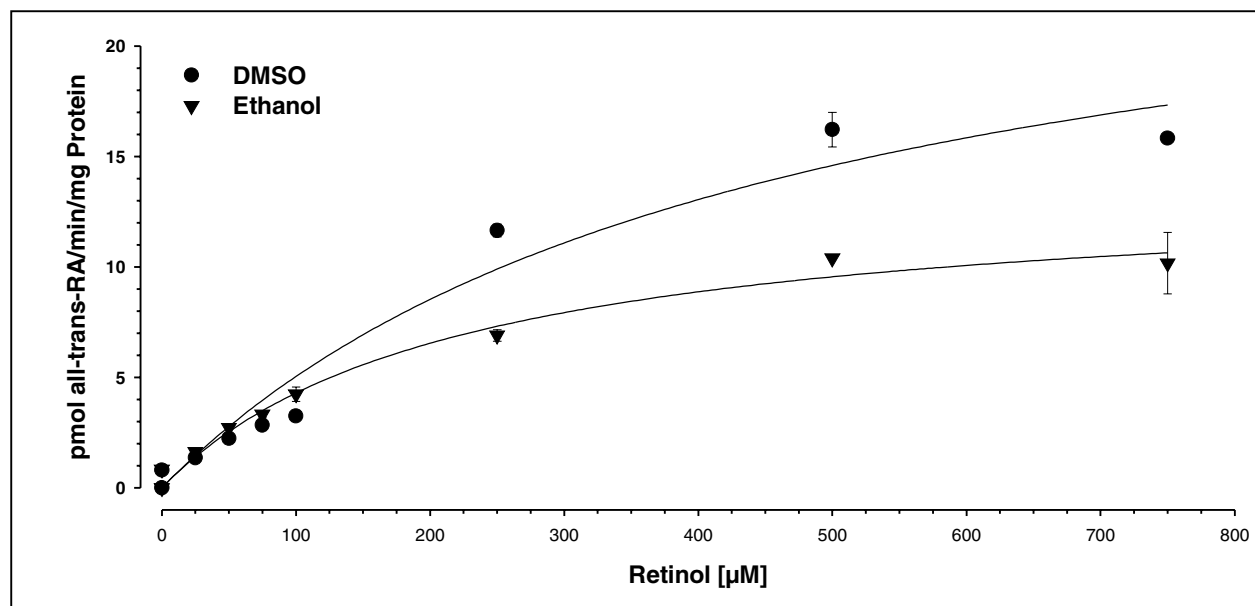


Abbildung 4.12: Oxidation von Retinol gelöst in DMSO oder Ethanol zu all-*trans*-RA durch cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms.

## 4 - Ergebnisse

Die Zugabe von Retinol erfolgte in Ethanol oder DMSO, wobei der Lösungsmittelanteil immer 1 Vol.-% betrug. In Abbildung 4.12 ist die Enzymkinetik dieser Zweistufenreaktion dargestellt. Die Meßpunkte der Enzymkinetik wurden durch Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung<sup>1</sup> verbunden. Die Bildung von all-*trans*-RA aus Retinol (gelöst in DMSO) erfolgte in Umsatzraten von  $0,80 \pm 0,03$  (10  $\mu\text{M}$  Retinol) bis  $16,2 \pm 0,8$  pmol/min/mg Protein (500  $\mu\text{M}$  Retinol). Bei einer Substratkonzentration von 750  $\mu\text{M}$  Retinol war keine Umsatzsteigerung mehr feststellbar. Bei Verwendung von Ethanol als Substratsolvent ging der Umsatz bei hohen Substratkonzentrationen stark zurück.

Die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) erfolgte durch doppelt reziprokes Auftragen nach Lineweaver-Burk. Der reziproke Wert der Substratkonzentration wurde gegen den reziproken Wert der Umsatzgeschwindigkeit aufgetragen, anschließend wurden  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Wert aus den Achsenabschnitten ermittelt.

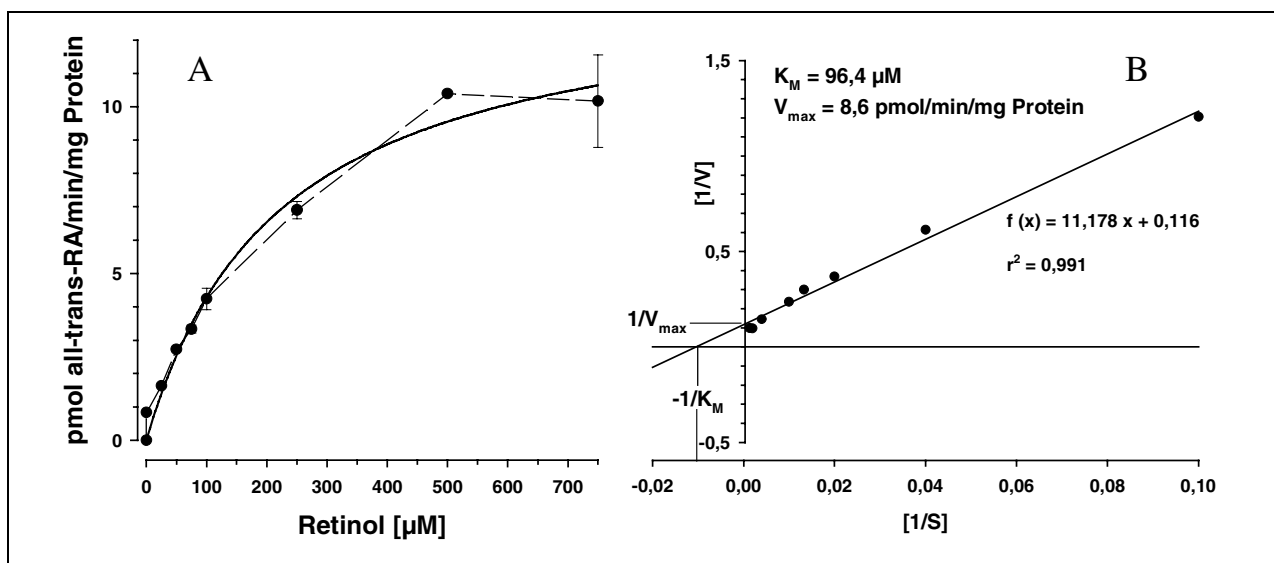


Abbildung 4.13: Enzymkinetik der Oxidation von Retinol (in Ethanol) zu all-*trans*-RA durch cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms (A), Lineweaver-Burk-Plot (B).

Die Michaelis-Menten-Enzymkinetik nach Zugabe von Retinol in Ethanol (Abb. 4.13 A) und die Darstellung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 4.13 B) ergaben für die Oxidation von Retinol zu all-*trans*-RA durch cytosolische Fraktionen der Darmmukosa des Schweines eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) von 96,4  $\mu\text{M}$  sowie eine maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) von

<sup>1</sup> Rechtwinklige Hyperbel 2. Polynoms mit  $V_0 = (V_{\max} * [S]) / K_M + [S]$ ;  $[S]$  = Substratkonzentration

## 4 - Ergebnisse

8,6 pmol/min/mg Protein. Die Berechnung des  $K_M$ - sowie  $v_{\max}$ -Wertes nach Zugabe von Retinol gelöst in DMSO ergab nach Lineweaver-Burk (Abb. 4.14 B) ähnliche Werte, obwohl die maximale Umsatzgeschwindigkeit in der Darstellung der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten (Abb. 4.14 A) wesentlich höher war (ca. 16 pmol/min/mg Protein). Auf die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen wird in der Diskussion (s. 5.2.1) eingegangen.

Die Inkubation mikrosomaler Fraktionen (0,2 mg Protein) aus Enterozyten des Schweinedarms führte zu keiner meßbaren Umsetzung von Retinol zu all-*trans*-RA.

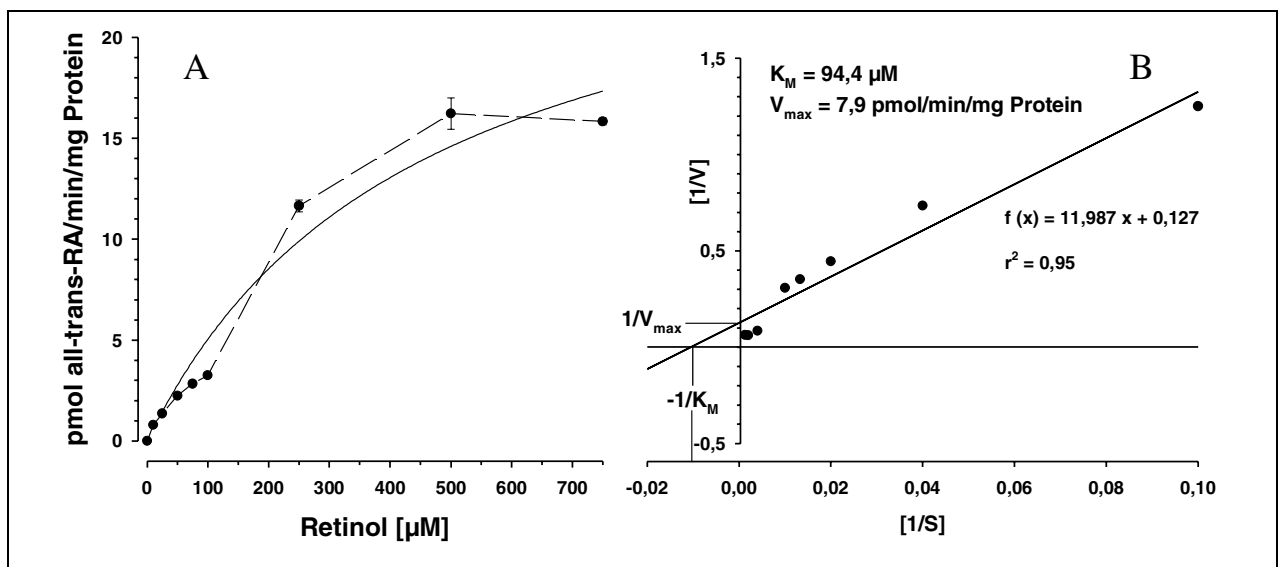


Abbildung 4.14: Enzymkinetik der Oxidation von Retinol (in DMSO) zu all-*trans*-RA durch cytosolische Fraktionen aus Enterozyten des Schweinedarms (A), Lineweaver-Burk-Plot (B).

### 4.3.2 Intestinaler Metabolismus von Vitamin A im Schwein nach Gabe von Leber oder Supplement

Der unter 3.4.2 detailliert beschriebene Versuch wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die Unterschiede im Plasmaprofil der Retinoide, die im Menschen nach Gabe von Vitamin A als Lebermahlzeit bzw. als Supplement auftraten, durch die Beteiligung des Gastrointestinaltraktes am oxidativen Metabolismus von hohen, CRBP II übersättigenden Mengen Retinol zu all-*trans*-RA erklärt werden könnte. Die Ergebnisse des *in vitro*-Experiments (s. 4.3.1) deuteten bereits daraufhin, daß lösliche Enzyme des Intestinaltraktes Retinol zu all-*trans*-RA zu oxidieren vermögen. Es sollte nun durch ein *in vivo*-Experiment überprüft werden, ob im Dünndarm ein

## 4 - Ergebnisse

oxidativer Metabolismus stattfindet und ob gebildete Metaboliten an das systemische Blut abgegeben und somit dem Organismus zur Verfügung gestellt werden.

Dazu wurde einem Schwein sowohl ein Portalvenen- als auch ein Zentralvenenkatheter gelegt (s. Abbildung 4.15). Nach Gabe von Vitamin A als Supplement (Teilexperiment 1) oder als Leber (Teilexperiment 2, 4 Tage später) wurde aus diesen Kathetern über einen Zeitraum von 24 h Blut abgenommen und daraus gewonnenes Plasma mittels HPLC Methode II / Probenaufbereitung A auf Retinoide analysiert. Die in Plasma aus Zentralvenen- und Portalvenenblut gemessenen Retinoid-Konzentrationen wurden verglichen, um zu klären, ob Retinoid-Metaboliten schon im Intestinum gebildet werden. Aufgrund der Möglichkeit, daß in der Leber gebildete und an den systemischen Blutkreislauf abgegebene Retinoid-Metaboliten in die intestinalen Blutgefäße rezirkulieren könnte, mußte angenommen werden, daß nur ein in Portalvenenplasma vorhandener Überschuß an Retinoiden von einem intestinalen Retinoid-Metabolismus herrührt.

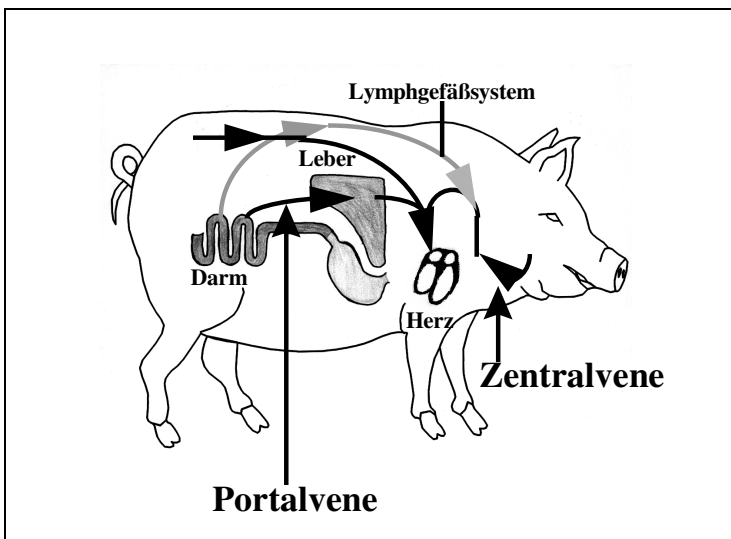


Abbildung 4.15:

Lage des Zentralvenen- und Portalvenenkatheters im Schwein.

### 4.3.2.1 Endogener Retinoid-Status im Schwein

Der endogene Retinoid-Status wurde vor beiden Experimenten in Portalvenen- und in Zentralvenenblut ermittelt (s. Tabelle 4.4). Vitamin A kam im Plasma überwiegend in Form von Retinol vor, in Form der Retinylester konnten nur Retinylpalmitat/-oleat gemessen werden. Vor dem zweiten Experiment waren die Retinolspiegel deutlich über die Werte des ersten

## 4 - Ergebnisse

Teilexperiments erhöht. Die Konzentration an Retinylpalmitat/-oleat war zu Beginn des zweiten Experiments jedoch bereits auf Werte abgesunken, die denen vor Teilexperiment 1 entsprachen.

Retinoid	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)			
	Portalvene	Zentralvene	Portalvene	Zentralvene
	vor Supplement	vor Supplement	vor Lebergabe	vor Lebergabe
Retinol	178,1	208,2	306,8	322,2
Retinylpalmitat/ -oleat (16:0/18:1)	70,3	131,0	17,9	83,8
All- <i>trans</i> -RA	1,2	0,9	n.d.	n.d.
13- <i>cis</i> -RA	0,5	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 4.4: Endogene Retinoid-Konzentrationen im Schwein.

Ein Vergleich der Konzentrationen in Portalvene und Zentralvene zeigte, daß die Retinolspiegel in Portalvene geringfügig niedriger waren als in Zentralvene, wohingegen die Retinylpalmitat/-oleat-Konzentrationen in Portalvenenblut deutlich verringert waren. Nur zu Beginn des ersten Teilexperiments waren geringe Mengen an all-*trans*-RA und 13-*cis*-RA meßbar (Nachweisgrenze 0,5 ng/ml).

### 4.3.2.2 Kinetik von Retinol und Retinylpalmitat/-oleat

Nach Gabe der Supplementation (5,6 mg Retinol /kg KG) stiegen die Retinol-Konzentrationen in Portalvenen- und Zentralvenenplasma innerhalb von 3 h 2,5- bis 3-fach über endogene Werte an. Nach dem Erreichen der maximalen Konzentration fand in Portalvene und Zentralvene eine sehr langsame Elimination von Retinol statt, so daß nach 24 h immer noch 2-fach erhöhte Werte vorlagen (Abbildung 4.16). Die maximale Konzentration für Retinylpalmitat/-oleat trat ebenfalls nach 3 h auf und war 60-fach (Portalvene) bzw. 35-fach (Zentralvene) erhöht (s. Tabelle 4.5). Nach 3 h sanken die Plasmakonzentrationen von Retinylpalmitat/-oleat sowohl in Portalvene als auch in Zentralvene kontinuierlich (s. Abbildung 4.17). Neben Retinylpalmitat/-oleat konnten noch Retinylstearat, -linoleat und -linolenat detektiert werden.

## 4 - Ergebnisse

Nach Verabreichung der Leber (8,7 mg Retinol/kg KG) im zweiten Teil des Experiments stiegen die Retinol-Konzentrationen auf vergleichbar hohe Konzentrationen wie nach Gabe des Supplements (s. Abbildung 4.16). Maximale Konzentrationen traten in Portal- und Zentralvene nach 3,5 h auf. In der Portalvene gingen die Retinolspiegel innerhalb von 24 h auf endogene Werte zurück, in der Zentralvene blieben sie hingegen erhöht. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich nach Lebergabe bei Retinylpalmitat/-oleat. Die  $C_{\max}$ -Werte für Retinylester, insbesondere für Retinylpalmitat/-oleat, betrugen trotz der höheren Dosis bei Leberverfütterung nur ca. 75% des Wertes nach Supplementation. Im Gegensatz dazu war der AUC-Wert für Retinylpalmitat/-oleat nach Leberverzehr geringfügig höher als nach Supplementation.

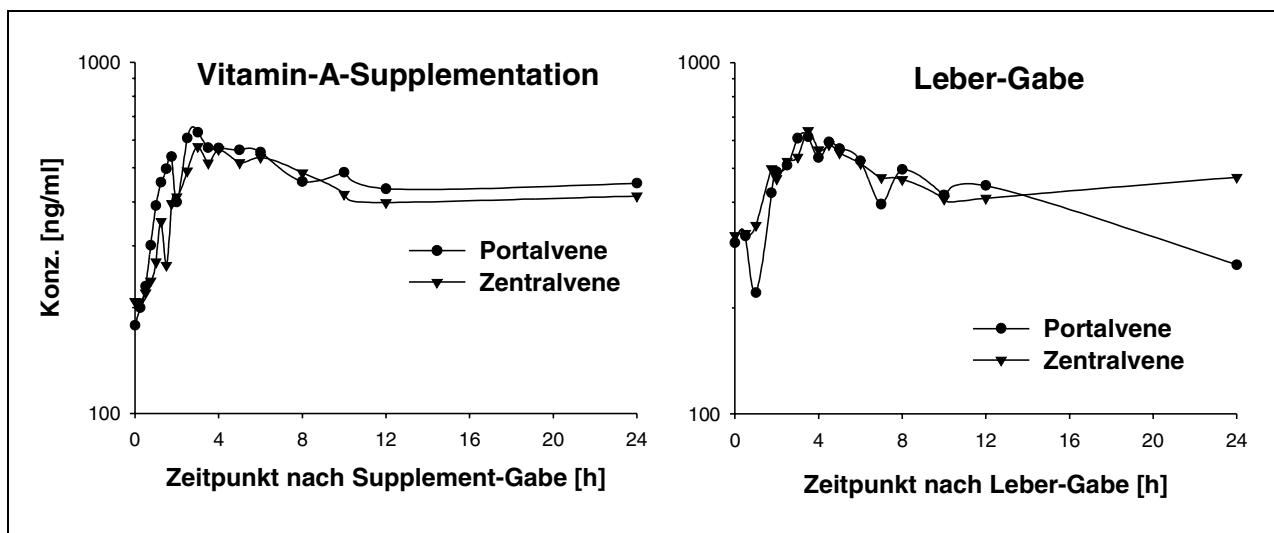


Abbildung 4.16: Kinetik von **Retinol** in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (5,6 mg/kg KG) bzw. als Leber (8,7 mg/kg KG).

Bei einem Vergleich der AUC-Werte fiel außerdem auf, daß die AUC-Werte von Retinol und Retinylpalmitat/-oleat in der Zentralvene nach Supplementation oder Leberfütterung vergleichbar hoch waren, wohingegen die AUC-Werte in der Portalvene nach Lebergabe niedriger waren als jene nach Supplementation.



## 4 - Ergebnisse

	Portalvene Supplement	Zentralvene Supplement	Portalvene Leber	Zentralvene Leber
<b><u>Retinol</u></b>				
$C_{\max}$ (ng/ml)	631,2	574,8	615,1	640,5
$T_{\max}$ (h)	3,0	3,0	3,5	3,5
AUC (ng*h/ml)	11198	10291	9857	10933
<b><u>Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1)</u></b>				
$C_{\max}$ (ng/ml)	4245	4498	2977	3243
$T_{\max}$ (h)	3,0	3,0	3,0	3,5
AUC (ng*h/ml)	28958	31136	24763	33276

Tabelle 4.5: Kinetische Parameter von Retinol und Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1) in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement bzw. Leber.

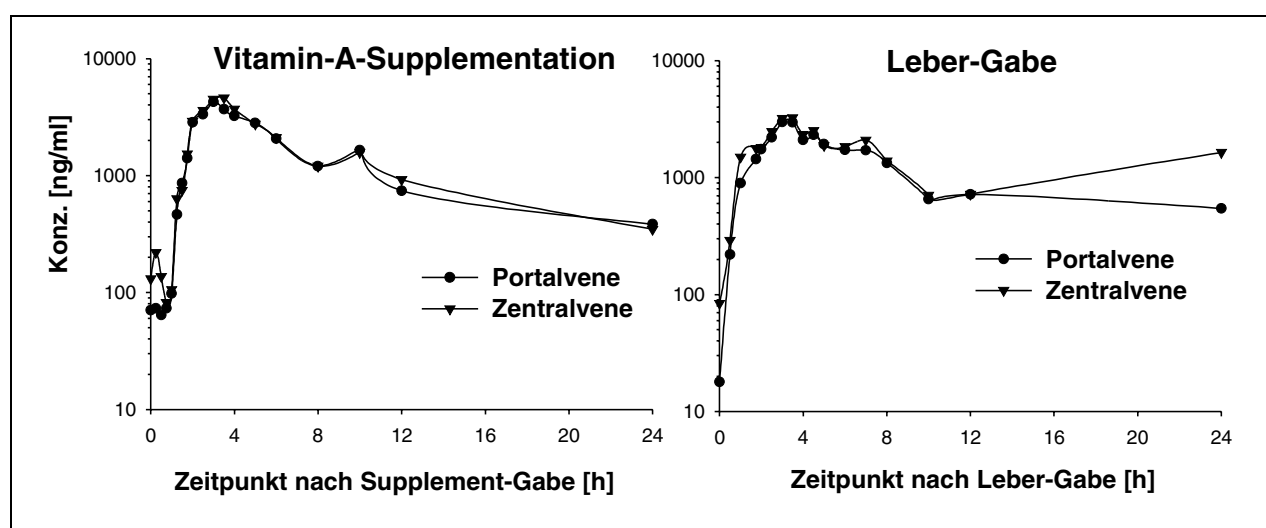


Abbildung 4.17: Kinetik von **Retinylpalmitat/-oleat** in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (5,6 mg/kg KG) bzw. als Leber (8,7 mg/kg KG).

## 4 - Ergebnisse

### 4.3.2.3 Kinetik der Retinsäuren

Die kinetischen Parameter der Retinsäuren sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Ein Unterschied in der Plasmakinetik der polaren Retinoid-Metaboliten zeigte sich eindeutig bei *all-trans*-RA. Nach Gabe des Supplements wurde in Portalvenenplasma nach 1,75 h eine sehr hohe Konzentration an *all-trans*-RA gemessen (16,4 ng/ml), die deutlich über dem in Zentralvenenplasma gemessenen Wert (3,1 ng/ml) lag.

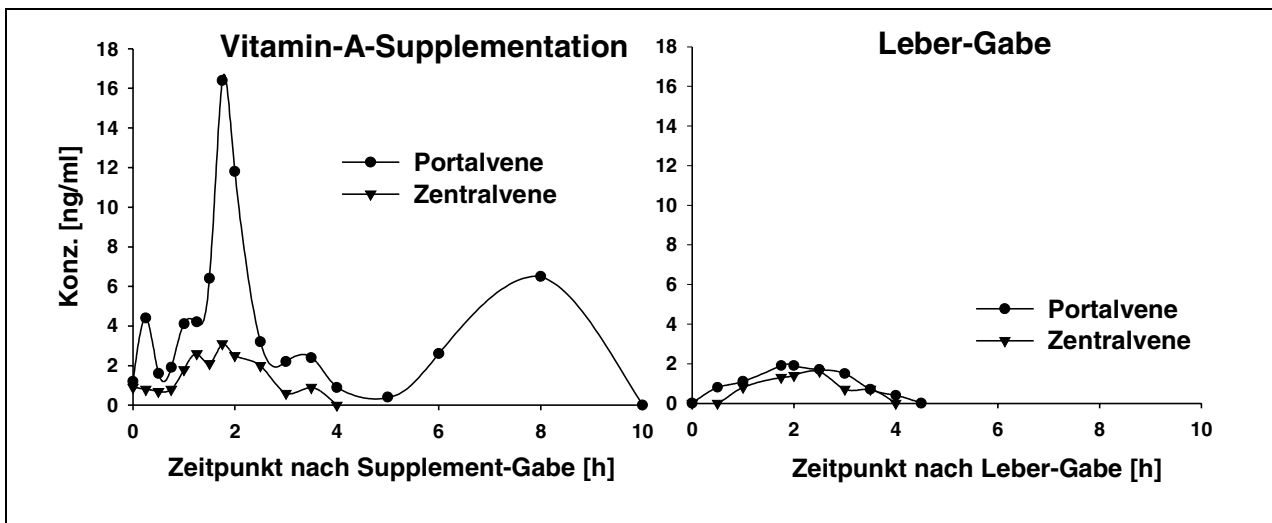


Abbildung 4.18: Kinetik von **all-trans-RA** in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (5,6 mg/kg KG) bzw. als Leber (8,7 mg/kg KG).

Die Darstellung der Kinetik von *all-trans*-RA (Abbildung 4.18) verdeutlicht, daß die Konzentration von *all-trans*-RA nach Supplementation in der Portalvene sehr schnell anstieg und über den gesamten Zeitraum der Probenahme über den in der Zentralvene gemessenen Werten lag. In einer zweiten Phase fand ein nochmaliger Anstieg der Portalvenenspiegel statt, der möglicherweise die enterohepatische Rezirkulation von aus der Leber über die Galle ausgeschiedener *all-trans*-RA oder deren Konjugate (z.B. RAG) reflektierte.

## 4 - Ergebnisse

	Portalvene Supplement	Zentralvene Supplement	Portalvene Leber	Zentralvene Leber
<b><u>All-trans-RA</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	16,4	3,1	1,9	1,6
T <sub>max</sub> (h)	1,75	1,75	1,75	2,5
AUC (ng*h/ml)	35,8	5,8	4,7	3,4
<b><u>13-cis-RA</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	6,3	4,5	7,5	7,3
T <sub>max</sub> (h)	1,75	2,0	3,0	3,0
AUC (ng*h/ml)	58,8	42,5	79,0	92,8
<b><u>9-cis-RA</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	2,2	1,1	3,8	3,1
T <sub>max</sub> (h)	2,0	2,5	3,0	2,5
AUC (ng*h/ml)	6,1	nicht berechnet <sup>1</sup>	31,0	40,1

Tabelle 4.6: Kinetische Parameter der RA-Isomere in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement bzw. Leber.

Nach Verfütterung der Leber war ein solcher Verlauf nicht festzustellen, obwohl die verabreichte Vitamin-A-Dosis höher war. Die Konzentration an *all-trans*-RA war in der Portalvene nur geringfügig höher als in der Zentralvene. 4 h nach Verabreichung der Leber konnte in Plasma aus beiden Venen keine *all-trans*-RA mehr nachgewiesen werden.

Die Kinetik von *13-cis*-RA (s. Abbildung 4.19) zeigte nach Supplementation einen ähnlichen Verlauf wie *all-trans*-RA. Auch hier waren die Spiegel in der Portalvene höher als in der Zentralvene, wenn auch nicht so deutlich wie bei *all-trans*-RA. Ebenso deutete sich nach 6 h ein zweiter Anstieg der Spiegel in der Portalvene an. Nach Verfütterung der Leber waren die Plasmaspiegel von *13-cis*-RA in Portalvene und Zentralvene nahezu vergleichbar hoch. Im Gegensatz zur Kinetik von *all-trans*-RA waren die *13-cis*-RA-Spiegel nach Leberversfütterung höher als nach Supplement-Gabe. Gleiches galt für *9-cis*-RA (s. Tabelle 4.6).

<sup>1</sup> Die Berechnung des AUC-Wertes war nicht möglich, da *9-cis*-RA nur an wenigen Zeitpunkten detektiert wurde.

## 4 - Ergebnisse

Ein Vergleich der AUC-Werte zeigte, daß nach Supplementation 13-*cis*-RA und all-*trans*-RA mit vergleichbar hohen Werten zur Retinsäure-Exposition in der Portalvene beitrugen, wohingegen nach Verfütterung der Leber 13-*cis*-RA und 9-*cis*-RA den Hauptanteil darstellten.

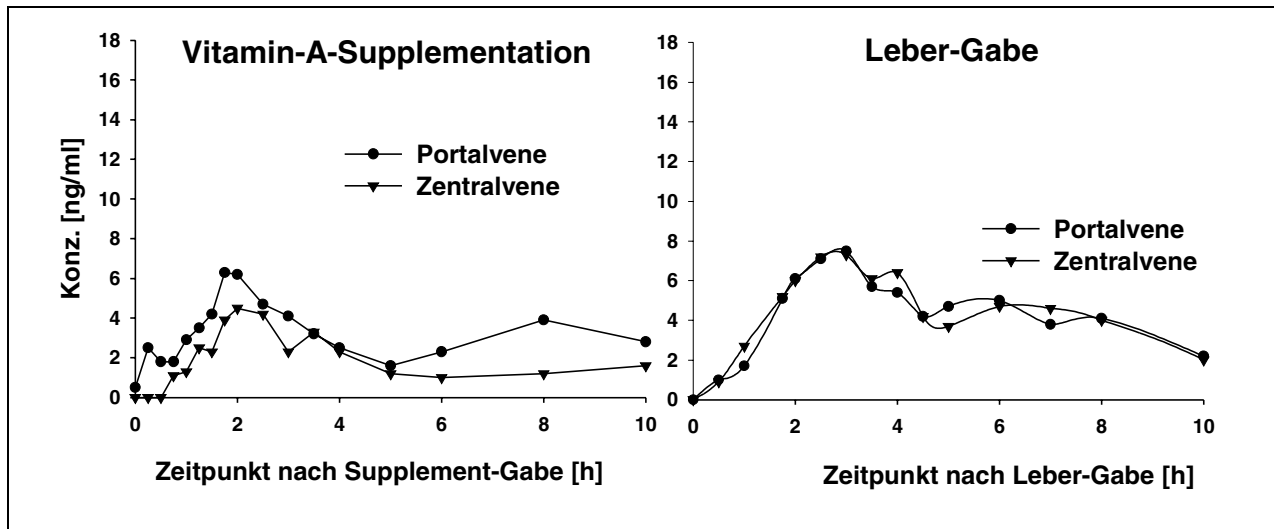


Abbildung 4.19: Kinetik von **13-*cis*-RA** in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (5,6 mg/kg KG) bzw. als Leber (8,7 mg/kg KG).

### 4.3.2.4 Kinetik der Phase-I- und Phase-II-Metaboliten

Die Biotransformation von Retinol und RA-Isomeren über den Phase-I- bzw. Phase-II-Metabolismus führte zur Bildung weiterer Retinoid-Metabolite. Im Plasma des Schweines konnten die Metaboliten all-*trans*-4-oxo-RA, 13-*cis*-4-oxo-RA, all-*trans*-RAG sowie das Glukuronid von Retinol (ROG) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß die weitere Verstoffwechselung von all-*trans*-RA überwiegend über die Glukuronidierung ablief, während 13-*cis*-RA zur entsprechenden 4-oxo-RA metabolisiert wurde. In Tabelle 4.7 sind die kinetischen Parameter der Metabolite zusammengefaßt.

## 4 - Ergebnisse

	Portalvene Supplement	Zentralvene Supplement	Portalvene Lebergabe	Zentralvene Lebergabe
<b><u>13-cis-4-oxo-RA</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	6,4	7,9	8,2	7,1
T <sub>max</sub> (h)	10,0	12,0	8,0	7,0
AUC (ng*h/ml)	93,6	95,4	95,7	81,8
<b><u>All-trans-RAG</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	9,6	7,4	7,9	6,2
T <sub>max</sub> (h)	2,5	3,0	5,0	4,5
AUC (ng*h/ml)	109,6	72,9	110,5	72,9
<b><u>ROG</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	154,5	108,6	33,5	34,6
T <sub>max</sub> (h)	2,5	2,5	6,0	7,0
AUC (ng*h/ml)	707,8	476,1	433,3	400,6

Tabelle 4.7: Kinetische Parameter einiger Phase-I- und Phase-II-Metaboliten in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement bzw. Leber.

Die C<sub>max</sub>- und die AUC-Werte für all-*trans*-RAG waren in Portalvenenplasma sowohl nach Supplementation als auch nach Lebergabe geringfügig höher als in Zentralvenenplasma. Ein solcher Unterschied war bei 13-*cis*-4-oxo-RA nicht zu erkennen. Nach Supplementation konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den ROG-Spiegeln in Portalvene und Zentralvene festgestellt werden. Sowohl der C<sub>max</sub>- als auch der AUC-Wert waren in der Portalvene deutlich höher als in der Zentralvene. Nach Leberverfütterung wurden wesentliche geringere Mengen ROG detektiert, ein Unterschied zwischen Portalvene und Zentralvene war anhand der Kinetik und der kinetischen Parameter kaum festzustellen (s. Abbildung 4.20).

## 4 - Ergebnisse

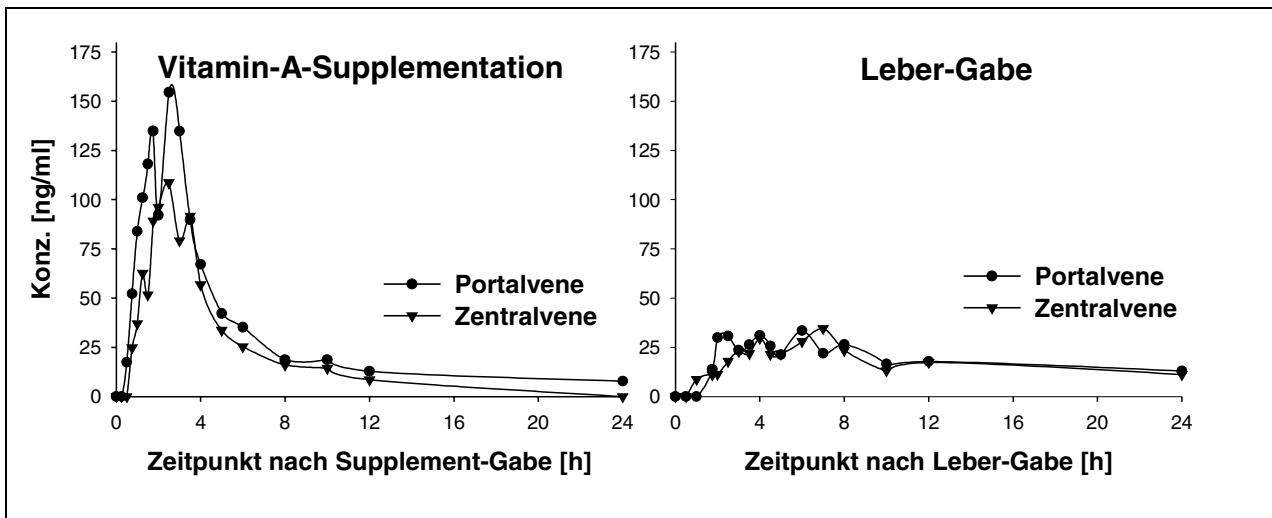


Abbildung 4.20: Kinetik von **Retinyl-β-D-Glukuronid (ROG)** in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (5,6 mg/kg KG) bzw. Leber (8,7 mg/kg KG).

### 4.3.2.5 Kinetik sonstiger Retinoid-Metabolite

Im Plasma des Schweines konnten neben Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1) noch weitere Retinylester detektiert werden. Dazu gehörten Retinylstearat (18:0), -linoleat (18:2) und -linolenat (18:3). Weiterhin konnten die *retro*-Retinoide 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR) und Anhydroretinol (AR) nachgewiesen werden. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 4.8 zusammengefaßt. Die Kinetiken der hier aufgeführten Ester entsprachen der des Hauptesters.

Bei den *retro*-Retinoiden fiel auf, daß Anhydroretinol (AR) nach Gabe von Leber in wesentlich höheren Konzentrationen auftrat als nach Gabe des Supplements. Die Plasmakonzentrationen waren in Portalvene und Zentralvene nach Leberverfütterung vergleichbar. Nach Supplementation war die  $C_{\max}$  von AR in der Portalvene deutlich höher als in der Zentralvene. Im Gegensatz zu AR waren die Konzentrationen von 14-HRR nach Supplementation höher als nach Leberverfütterung. Bezüglich des  $C_{\max}$ - und des AUC-Wertes war zwischen Portal- und Zentralvene nur ein geringfügiger Unterschied zu erkennen. In der Portalvene wurden marginal höhere Werte gemessen. Nach Supplementation traten die  $C_{\max}$ -Werte für AR und 14-HRR etwas früher auf als nach Leberfütterung.

## 4 - Ergebnisse

	Portalvene Supplement	Zentralvene Supplement	Portalvene Lebergabe	Zentralvene Lebergabe
<b><u>Retinylstearat (18:0)</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	1358,0	1499,0	1619,0	1787,0
T <sub>max</sub> (h)	3,0	3,5	3,5	3,5
AUC (ng*h/ml)	9782,0	10682,1	12601,8	15588,7
<b><u>Retinylinoleat (18:2)</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	281,4	313,7	160,9	173,1
T <sub>max</sub> (h)	3,0	3,0	3,5	3,5
AUC (ng*h/ml)	1572,0	1717,4	1555,6	1815,1
<b><u>Retinylinolenat (18:3)</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	100,6	114,0	125,8	133,8
T <sub>max</sub> (h)	3,0	3,5	3,5	3,5
AUC (ng*h/ml)	568,2	719,7	883,5	1063,7
<b><u>Anhydroretinol (AR)</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	14,0	9,0	15,2	15,9
T <sub>max</sub> (h)	3,5	2,0	4,5	4,5
AUC (ng*h/ml)	38,9	50,3	146,6	127,5
<b><u>14-hydroxy-4,14-retro-retinol (14-HRR)</u></b>				
C <sub>max</sub> (ng/ml)	4,0	3,5	3,2	2,3
T <sub>max</sub> (h)	3,0	2,0	3,0	4,0
AUC (ng*h/ml)	75,1	60,3	14,1	20,7

Tabelle 4.8: Kinetische Parameter einiger Retinylester sowie der retro-Retinoide in Portalvene/Zentralvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement oder Leber.

## 4 - Ergebnisse

### 4.3.2.6 Zusammenfassung

Um die Unterschiede in der Plasmakinetik der polaren Metaboliten nach Supplementation und Lebergabe zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4.21 Chromatogrammausschnitte von analysierten Plasmaproben dargestellt. In Abbildung 4.21 A wurden die Chromatogramme der Portalvenen- (PV) und der Zentralvenenprobe (ZV), die 1,75 h nach Gabe des Supplements (bei Auftreten der  $C_{\max}$  von all-*trans*-RA) entnommen wurden, übereinandergelegt.

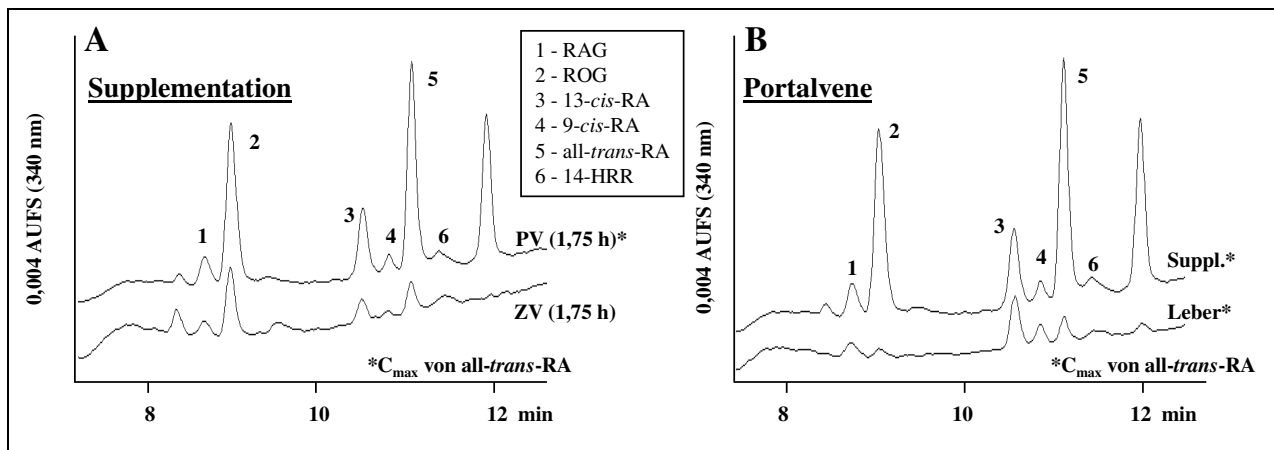


Abbildung 4.21: Chromatogrammausschnitte. A: Plasmaproben der Portalvene (PV) bzw. Zentralvene (ZV) nach Gabe von Vitamin A als Supplement. B: Plasmaproben der Portalvene nach Gabe von Vitamin A als Supplement (Suppl.) bzw. als Leber.

Die Konzentrationen der Retinsäuren (3-5) in der Portalvene (PV) waren deutlich höher als jene in der Zentralvene (ZV). Ebenso waren die Portalvenenspiegel der Glukuronide (RAG, ROG) erhöht. In Abbildung 4.21 B wurden die Chromatogramme der Portalvenenproben nach Supplementation (Suppl.) und Leberverfütterung (Leber) übereinandergelegt, in denen die  $C_{\max}$  von all-*trans*-RA auftrat. Es wurde deutlich, daß die Konzentration an all-*trans*-RA nach Leberverfütterung wesentlich geringer war. Auch die Konzentrationen der Glukuronide (RAG, ROG) waren niedriger.

Der Metabolismus von Vitamin A im Schwein wies je nach der Verabreichungsform (Supplement oder Leber) bezüglich der Kinetik von Retinoiden in Portalvenen- bzw. Zentralvenenplasma besondere Merkmale auf:



## 4 - Ergebnisse

---

- Die relative Bioverfügbarkeit von Vitamin A war gemessen an den AUC-Werten von Retinylpalmitat/-oleat in der Zentralvene nach Gabe des Supplements (31137 ng\*h/ml) bzw. nach Verfütterung der Leber (33276 ng\*h/ml) nahezu vergleichbar, obwohl die verabreichte Vitamin-A-Dosis nach Leber höher war.
- Nach Supplementation traten in der Portalvene sehr hohe all-*trans*-RA-Spiegel ( $C_{\max}$  16,4 ng/ml), die um ein Vielfaches über den in der Zentralvene gemessenen Konzentrationen ( $C_{\max}$  3,1 ng/ml) lagen. Auch die Konzentrationen an 13-*cis*-RA waren in der Portalvene ( $C_{\max}$  6,3 ng/ml) höher als in der Zentralvene ( $C_{\max}$  4,5 ng/ml). Nach Lebergabe konnte kein Unterschied bezüglich der Kinetik der RA-Isomere in Portalvene oder Zentralvene erkannt werden.
- Ein Vergleich der AUC-Werte der Glukuronide (all-*trans*-RAG, ROG) zeigte, daß nach Supplementation die in der Portalvene ermittelten Werte höher waren als die in der Zentralvene. Nach Vitamin-A-Supplementation wurde ein Großteil des Retinols zu ROG glukuronidiert.

### 4.4 Einfluß von Phytol/Phytansäure auf Teratogenität, Metabolismus und Kinetik von all-*trans*-RA bzw. Retinol

Es hat sich gezeigt, daß durch Verabreichung eines synthetischen RAR-Liganden (Am580) hervorgerufene, teratogene Effekte in der Maus zum Teil durch gleichzeitige Gabe eines synthetischen RXR-Liganden (z.B. LG1069) potenziert werden (Elmazar et al. 1997). Durch die alleinige Verabreichung des RXR-Liganden konnten keine teratogenen Effekte ausgelöst werden. Ersetzte man den synthetischen RAR-Liganden durch den natürlichen RAR-Liganden all-*trans*-RA oder dessen Vorläufersubstanz all-*trans*-Retinol, so konnte ebenfalls eine Potenzierung der RAR-vermittelten teratogenen Effekte erzielt werden (Elmazar und Nau 1998). Auch die gleichzeitige Gabe eines natürlichen RXR-Liganden (Phytansäure) mit einem synthetischen RAR-Liganden (Am580) führten zu einer Potenzierung der durch Am580 induzierten Mißbildungen, obwohl die alleinige Gabe von Phytansäure keine teratogenen Effekte hervorrief (Elmazar und Nau 1998).

Ein Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob die gleichzeitige Gabe einer schwach teratogenen Dosis des natürlichen RAR-Liganden all-*trans*-RA (RA; 20 mg/kg KG) oder seiner Vorstufe all-

## 4 - Ergebnisse

---

*trans*-Retinol (ROH; 50 mg/kg KG) mit dem natürlichen RXR-Liganden Phytansäure (PA; 100 mg/kg KG) oder seiner Vorstufe Phytol (POH; 500 mg/kg KG) ähnliche synergistische Effekte hervorrufen würde. Zu diesem Zweck wurden, wie unter 3.3.4 beschrieben, Untersuchungen zur Teratogenität, zur Plasmakinetik in nichtträchtigen Mäusen und zur Verteilung von Retinoiden in embryonalem Gewebe und maternalem Plasma von trächtigen Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten nach Gabe von RA bzw. ROH allein oder zusammen mit PA bzw. POH.

### 4.4.1 Teratogenität nach Einzelgaben von POH bzw. PA an trachtige Mäuse

Nach Gabe von Einzeldosen PA bzw. POH an trachtige Mäuse (GD 8,25) traten Resorptionsraten von 20 % (PA) bzw. 3 % (POH) auf. Die Fetengewichte betrugen  $1,18 \pm 0,13$  g (PA; n=51) bzw.  $1,26 \pm 0,13$  g (POH, n=62). Die Gabe von PA bzw. POH erfolgte in Dosen, bei denen keine teratogenen Effekte zu beobachten waren (s. Tabelle III im Anhang).

### 4.4.2 Endogene Retinoide

Plasma- und Fetusproben dieser Studie wurden mittels HPLC-Methode II kombiniert mit Probenaufbereitung A analysiert. Da nur geringe Mengen Plasma pro Maus zur Verfügung standen, konnte nur mit einem Probengewicht von 25 µl (statt 100 µl) gearbeitet werden. Die Nachweisgrenzen der Retinoide betrugen bei dieser modifizierten Probenaufbereitung 2,0 ng/ml für 13-*cis*- und all-*trans*-RA, 2,8 ng/ml für 9-*cis*-RA, 13-*cis*-4-oxo- und all-*trans*-4-oxo-RA und 4 ng/ml für 14-HRR.

#### 4.4.2.1 Nichttrachtige Mäuse

Im Plasma von unbehandelten, nichtträchtigen Mäusen (n=5) konnten Retinol ( $180,1 \pm 26,4$  ng/ml), Retinylpalmitat ( $116,4 \pm 41,4$  ng/ml), Retinylstearat ( $52,1 \pm 24,6$  ng/ml) und in zwei Plasmaproben auch Retinyllinoleat ( $16,8 \pm 4,1$  ng/ml) bestimmt werden. Andere Metaboliten wurden nicht detektiert.

## 4 - Ergebnisse

---

### 4.4.2.2 Trächtige Mäuse und Embryogewebe (GD 11)

In Plasma unbehandelter, trächtiger Mäuse (n=4) konnten Retinol ( $23,4 \pm 5,4$  ng/ml) und Retinylpalmitat/-oleat ( $35,6 \pm 5,4$  ng/ml) detektiert werden. Andere Metaboliten waren nicht nachweisbar. In embryonalem Gewebe unbehandelter Kontrolltiere (n=4) konnten neben Retinol ( $98,8 \pm 9,5$  ng/g) und Retinylpalmitat/-oleat ( $41,8 \pm 25,5$  ng/g) auch all-*trans*-RA ( $7,8 \pm 0,4$  ng/g) und all-*trans*-4-oxo-RA ( $1,2 \pm 0,4$  ng/g) bestimmt werden.

### **4.4.3 Gabe von RA allein oder mit PA bzw. POH**

#### 4.4.3.1 Teratogenitäts-Untersuchungen

Die orale Gabe von RA an trächtige Mäuse (GD 8,25) führte zu hohen Resorptionen der Feten (44 %). Äußerlich sichtbare Mißbildungen der lebenden Feten waren Anotie (12 %), Schwanzmißbildungen (22 %) und Exenzephalie (17 %). Spina bifida (2 %) trat nur in einem Fall auf, Mikrognathie wurde gar nicht beobachtet (s. Abbildung 4.22).

Die gleichzeitige Gabe von PA oder POH führte zu einer Reduktion der Resorptionsraten auf 35 % (PA) bzw. 31 % (POH). Nur bei gleichzeitiger Gabe von POH war die Reduktion statistisch signifikant ( $P < 0,05$ , Fisher's Exact Test). Nach PA-Gabe traten Spina bifida und Mikrognathie je in einem Fall auf. Anotie war auf 23 % (nicht signifikant), Exenzephalie auf 20 % (nicht signifikant) erhöht. Schwanzmißbildungen traten bei 20 % der Feten auf. Nach POH-Gabe traten Spina bifida und Mikrognathie in je einem Fall auf. Anotie wurde auf 4 % (nicht signifikant), Exenzephalie auf 14 % (nicht signifikant) reduziert. Es konnten in diesem Fall keine Schwanzmißbildungen beobachtet werden.

Die Fetengewichte betrugen  $1,18 \pm 0,13$  g (RA),  $1,17 \pm 0,13$  g (RA+PA) und  $1,18 \pm 0,12$  g (RA+POH). Bezüglich der Fetengewichte war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen.

## 4 - Ergebnisse

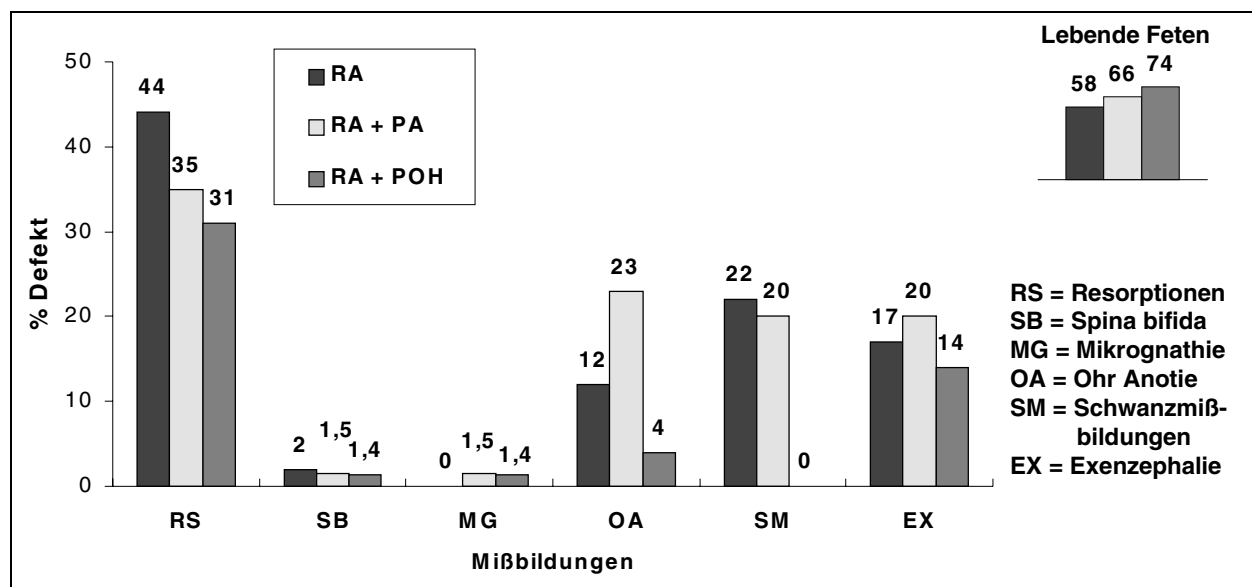


Abbildung 4.22: Teratogene Effekte in der Maus nach oraler Gabe von all-trans-Retinsäure (RA, 20mg/kg KG) allein oder bei gleichzeitiger Gabe von Phytansäure (PA, 100 mg/kg KG) bzw. Phytol (POH, 500 mg/kg KG an GD 8,25).

### 4.4.3.2 Plasmakinetik in nichtträchtigen Mäusen

In Abbildung 4.23 ist ein charakteristisches Chromatogramm einer Mausplasma-Probe dargestellt, die 1 h nach Behandlung mit RA entnommen wurde. Durch Koelution mit Standardsubstanzen konnten all-*trans*-RA (7), 9-*cis*-RA (6) und 13-*cis*-RA (5) detektiert werden. Weiterhin wurden die Phase-I-Metaboliten all-*trans*-4-hydroxy-RA (2) und all-*trans*-4-oxo-RA (1) sowie die Phase-II-Metaboliten 13-*cis*-RAG (3) und all-*trans*-RAG (4) identifiziert. Die Bestätigung des Auftretens von Glukuroniden erfolgte durch Hydrolyse mit  $\beta$ -Glukuronidase (s. 3.8.1) und anschließender Chromatographie, wobei die Signale der Glukuronide nicht mehr auftraten.

Bei Verwendung dieser HPLC-Methode koeluierten 13-*cis*-4-oxo-RA und all-*trans*-4-hydroxy-RA (2). Es stellte sich heraus, daß das Verhältnis der Signalflächen bei den beiden Detektionswellenlängen ( $FE_{340nm}/FE_{356nm}$ ; s. 3.7.5) des im Mausplasma auftretenden Peaks dem der Referenzsubstanz von all-*trans*-4-hydroxy-RA entsprach. Das Peakeluat wurde aufgefangen, um mittels HPLC-DAD-MS-MS analysiert zu werden (s. 4.6).

## 4 - Ergebnisse

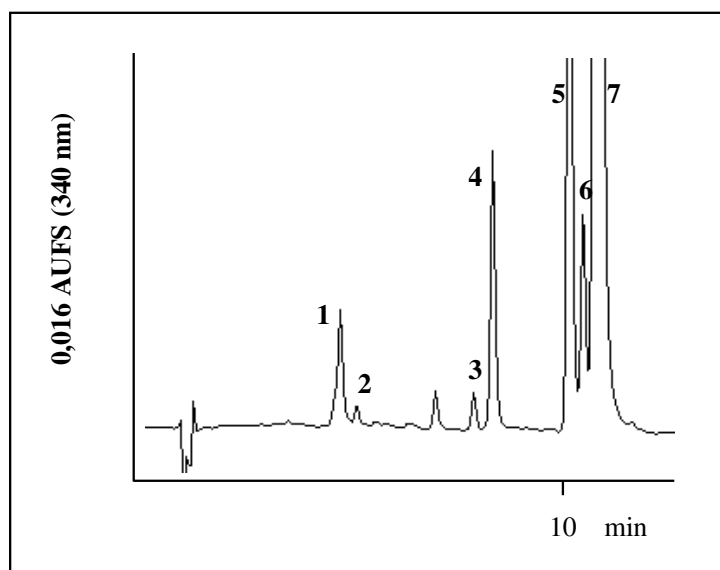


Abbildung 4.23: Ausschnitt eines Chromatogramms einer Plasmaprobe (HPLC-Methode II/ Probenaufbereitung A) 1 h nach Gabe von RA.

1: all-trans-4-oxo-RA, 2: all-trans-4-hydroxy-RA, 3: 13-cis-RAG, 4: all-trans-RAG, 5: 13-cis-RA, 6: 9-cis-RA, 7: all-trans-RA.

Der Verlauf der Plasmakinetik von all-*trans*-RA nach Behandlung der Mäuse mit RA allein oder zusammen mit POH bzw. PA ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Nach Gabe von RA stieg die Plasmakonzentration innerhalb von 1 h auf  $5020 \pm 3644$  ng/ml ( $n=3$ ) an und sank dann bis 4 h auf ca. die Hälfte der  $C_{\max}$  ab. Bei gleichzeitiger Gabe von POH stiegen die all-*trans*-RA-Spiegel im Plasma auf  $3333 \pm 1019$  ng/ml ( $n=3$ ), die Elimination erfolgte dann aber wesentlich schneller, so daß nach 4 h nur noch Konzentrationen um 200 ng/ml gemessen wurden. Bei gleichzeitiger Applikation von RA und PA stiegen die all-*trans*-RA-Konzentrationen ebenfalls nach 1h auf vergleichbare Konzentrationen an ( $4297 \pm 1513$  ng/ml,  $n=3$ ). Die Elimination erfolgte hier jedoch ebenfalls schneller als nach alleiniger RA-Gabe, so daß nach 4 h wesentlich geringere Plasmaspiegel auftraten.

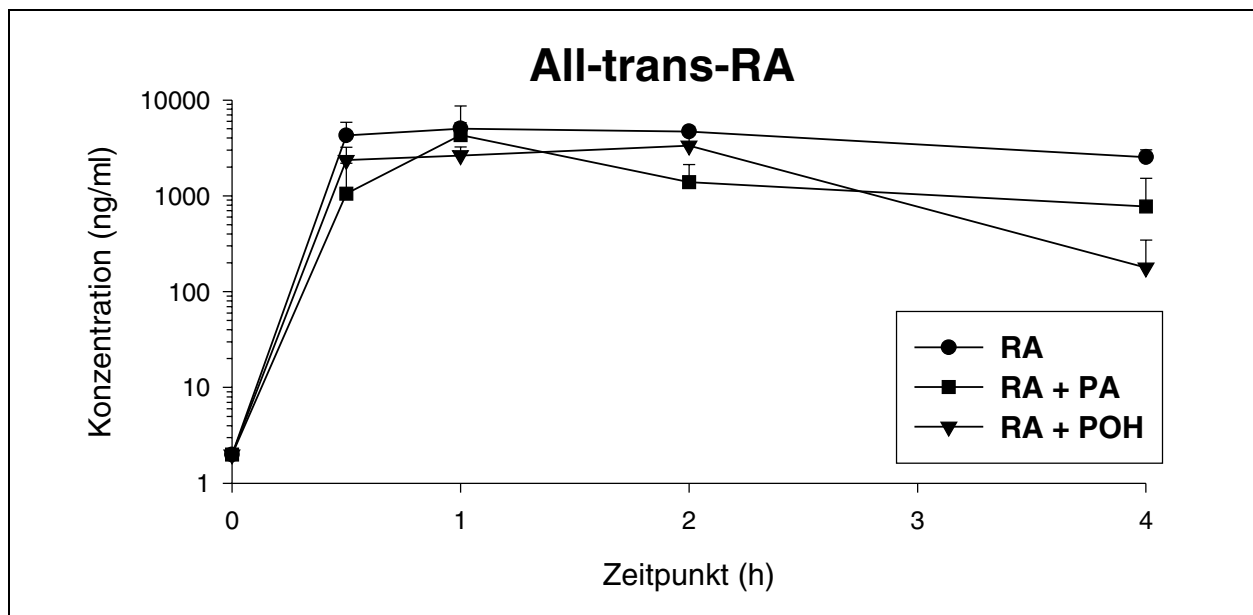


Abbildung 4.24: Plasmakinetik von all-trans-RA in nichtträchtigen Mäusen nach Gabe von RA allein oder mit POH bzw. PA (n=3 pro Zeitpunkt und Gruppe).

In Tabelle 4.9 sind die  $C_{\max}$ - und die  $AUC_{0-4h}$ -Werte für die Retinoid-Metaboliten vergleichend gegenübergestellt. Zwar wurden nach gleichzeitiger Applikation von PA bzw. POH geringere  $C_{\max}$ - und AUC-Werte ermittelt, signifikante Unterschiede waren jedoch nur bezüglich der AUC-Werte von 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA nach PA-Gabe sowie bezüglich des Phase-I-Metaboliten all-*trans*-4-oxo-RA nach PA- oder POH-Gabe festzustellen. Ein Einfluß von POH bzw. PA auf die Plasmakinetik teratogener Dosen all-*trans*-RA war nur in geringem Umfang festzustellen und konnte statistisch nicht abgesichert werden ( $P > 0,05$  Student's t-test).

## 4 - Ergebnisse

Retinoid	C <sub>max</sub> (ng/ml)		
	RA	RA + PA	RA + POH
All- <i>trans</i> -RA	5020 ± 3644	4297 ± 1513	3333 ± 1019
13- <i>cis</i> -RA	728,8 ± 483,3	261,0 ± 18,8	534,0 ± 115,5
9- <i>cis</i> -RA	221,0 ± 141,5	56,8 ± 5,7	167,2 ± 31,1
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	449,7 ± 1,9	<b>72,5 ± 65,7***</b>	<b>250,8 ± 55,8**</b>
All- <i>trans</i> -4-hydroxy-RA	157,7 ± 28,0	58,8 ± 55,5	88,0 ± 19,8
All- <i>trans</i> -RAG	414,0 ± 160,5	304,3 ± 121,9	367,5 ± 107,1
13- <i>cis</i> -RAG	243,2 ± 65,0	98,3 ± 45,5	180,8 ± 76,7
Retinoid	AUC <sub>0-4h</sub> (ng •h/ml)		
	RA	RA + PA	RA + POH
All- <i>trans</i> -RA	15473 ± 4893	6594 ± 3570	8339 ± 2571
13- <i>cis</i> -RA	1974 ± 591	<b>525,7 ± 209,3*</b>	1226 ± 337
9- <i>cis</i> -RA	501,5 ± 164,8	<b>125,5 ± 44,7*</b>	349,5 ± 90,6
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	805,4 ± 142,0	361,5 ± 274,7	<b>490,2 ± 140,1*</b>
All- <i>trans</i> -4-hydroxy-RA	318,2 ± 75,8	358,9 ± 272,6	200,5 ± 59,1
All- <i>trans</i> -RAG	1334 ± 607	459,4 ± 205,5	831,0 ± 280,6
13- <i>cis</i> -RAG	662,1 ± 164,1	365,8 ± 86,6	419,3 ± 202,8

(Signifikant geringer als Werte nach RA-Gabe, \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; Student's t-test)

Tabelle 4.9: C<sub>max</sub>- und AUC<sub>0-4h</sub>-Werte für polare Retinoide in Mausplasma nach Gabe von RA allein bzw. mit PA oder POH (n=3 pro Gruppe)

### 4.4.3.3 Maternale und embryonale Exposition

In Tabelle 4.10 sind die 4 h nach Gabe von RA allein oder zusammen mit POH bzw. PA (n=4 pro Gruppe) in embryonalem Gewebe (GD11) bzw. in maternalem Plasma gemessenen Konzentrationen aufgeführt. Sowohl im Plasma als auch in Embryonen konnten beträchtliche Konzentrationen an all-*trans*-RA gemessen werden. Weiterhin wurden die Isomere 13-*cis*-RA und 9-*cis*-RA detektiert.

## 4 - Ergebnisse

C <sub>4h</sub> Plasma (ng/ml)			
Retinoid	RA	RA + PA	RA + POH
All-trans-RA	151,7 ± 50,9	<b>35,7 ± 21,5**</b>	185,3 ± 139,8
13-cis-RA	29,9 ± 10,5	<b>11,7 ± 6,7*</b>	33,7 ± 19,2
9-cis-RA	6,1 ± 1,6	<b>2,4 ± 1,0**</b>	4,0 ± 1,6
All-trans-4-oxo-RA	136,2 ± 44,7	<b>22,2 ± 14,7**</b>	136,3 ± 44,7
All-trans-4-hydroxy-RA	69,7 ± 17,9	<b>27,9 ± 13,4**</b>	98,6 ± 68,5
All-trans-RAG	75,6 ± 24,6	<b>27,6 ± 10,1*</b>	58,6 ± 20,3
13-cis-RAG	29,9 ± 10,5	42,1 ± 20,1	43,6 ± 11,5
Retinol	15,9 ± 4,4	18,6 ± 5,3	15,1 ± 2,9
Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1)	90,6 ± 55,3	42,8 ± 17,4	39,0 ± 16,6
C <sub>4h</sub> Embryo (ng/g)			
Retinoid	RA	RA + PA	RA + POH
All-trans-RA	207,2 ± 106,7	<b>64,3 ± 22,1*</b>	182,9 ± 136,4
13-cis-RA	19,0 ± 11,5	13,1 ± 3,6	25,8 ± 17,0
9-cis-RA	7,1 ± 3,4	5,6 ± 1,2	11,1 ± 7,1
All-trans-4-oxo-RA	66,8 ± 11,6	<b>38,6 ± 3,9**</b>	68,4 ± 29,6
All-trans-4-hydroxy-RA	190,0 ± 8,9	<b>102,6 ± 28,5***</b>	149,3 ± 39,5
All-trans-RAG	7,0 ± 1,5	<b>4,0 ± 1,0*</b>	6,6 ± 2,0
13-cis-RAG	4,2 ± 1,9	<b>n.d.**</b>	<b>n.d.**</b>
Retinol	56,2 ± 2,7	49,2 ± 5,0	52,6 ± 4,3
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	74,3 ± 5,8	82,4 ± 12,5	77,5 ± 9,0
(Signifikant geringer als Werte nach RA-Gabe, * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; Student`s t-test)			

Tabelle 4.10: Retinoidspiegel in maternalem Plasma und embryonalem Gewebe 4 h nach Gabe von RA allein bzw. mit PA oder POH (n=4 pro Gruppe).



## 4 - Ergebnisse

Als oxidative Metaboliten von *all-trans*-RA wurden *all-trans*-4-hydroxy-RA und *all-trans*-4-oxo-RA gemessen. Durch Phase-II-Metabolismus wurden außerdem die Glukuronide *all-trans*-RAG und 13-*cis*-RAG gebildet. Bei gleichzeitiger Verabreichung von RA und POH konnten in Plasma und Embryonen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Konzentrationen der genannten Metaboliten festgestellt werden. Nach gleichzeitiger Applikation von RA und PA waren die Konzentrationen sowohl der Muttersubstanz *all-trans*-RA als auch die seiner Metaboliten in Plasma und Embryonen signifikant verringert. In Abbildung 4.25 ist dieses Ergebnis verdeutlicht.

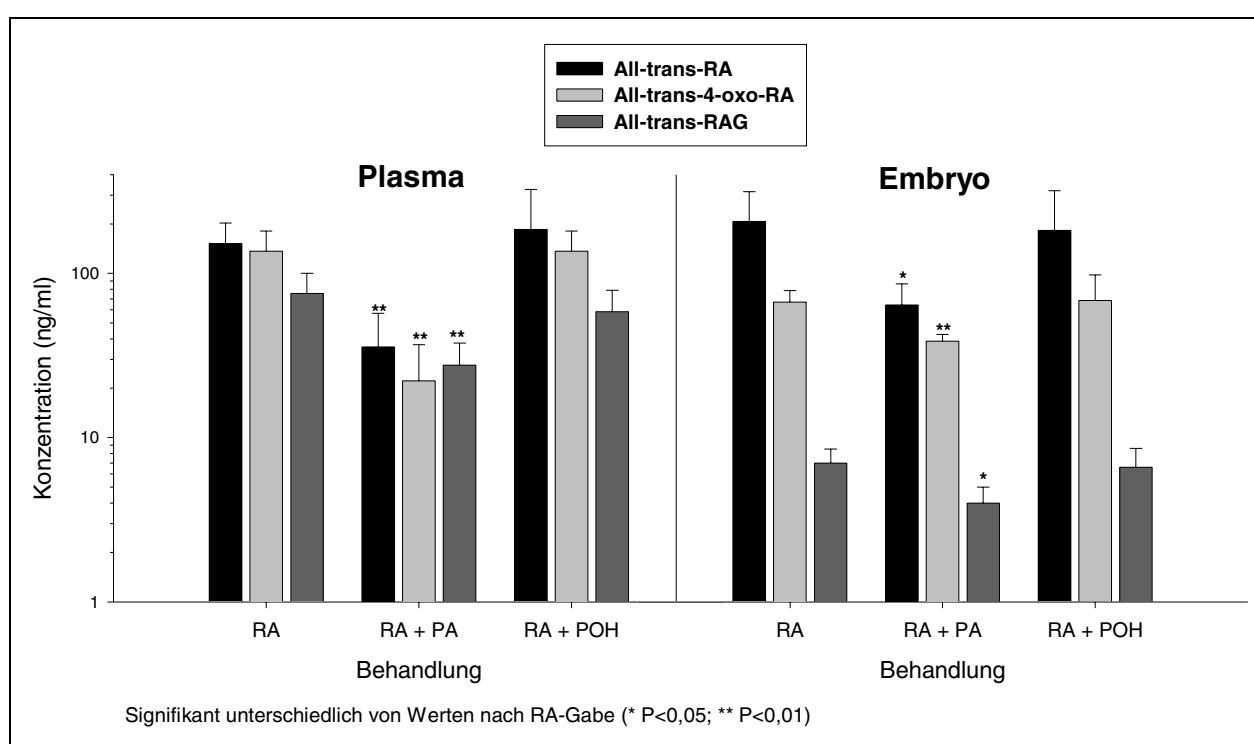


Abbildung 4.25: Vergleich der Retinoidspiegel in Plasma und Embryonen 4 h nach Gabe von RA allein oder mit PA bzw. POH (n=4 pro Gruppe).

### 4.4.4 Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA

#### 4.4.4.1 Teratogenitäts-Untersuchungen

Die orale Gabe von ROH in einer Dosis von 50 mg/kg KG an trächtige Mäuse (GD 8,25) führte zu hohen Resorptionsraten (39 %). Äußerlich sichtbare Mißbildungen bei den lebenden Feten waren Anotie (19 %) und Exenzephalie (28 %). Das Auftreten anderer Retinoid-typischer Mißbildungen wie Spina bifida, Mikrognathie oder Schwanzmißbildungen konnte bei dieser Dosis nicht beobachtet werden (s. Abbildung 4.26). Die gleichzeitige Gabe von POH oder PA

## 4 - Ergebnisse

führte zu einer signifikanten Reduktion der Resorptionen auf 5 % bei gleichzeitiger POH-Gabe bzw. auf 18 % bei gleichzeitiger PA-Gabe. Die Signifikanz wurde mit Fisher's Exact Test überprüft ( $P < 0,0001$  nach POH-,  $P < 0,0006$  nach PA-Gabe). Nach POH-Gabe waren Anotie und Exenzephalie gar nicht zu beobachten. Nach PA-Gabe war das Auftreten von Anotie auf 1,3 % (1 betroffener Fetus) reduziert, Schwanzdefekte und Exenzephalie traten ebenfalls nicht auf.

Die Fetengewichte betrugen  $1,23 \pm 0,14$  g (ROH),  $1,29 \pm 0,13$  g (ROH+POH) und  $1,23 \pm 0,10$  g (ROH+PA). Die Fetengewichte waren nach Applikation von ROH+POH im Vergleich zur alleinigen ROH-Gabe signifikant erhöht ( $P < 0,01$ ; Student's t-test).

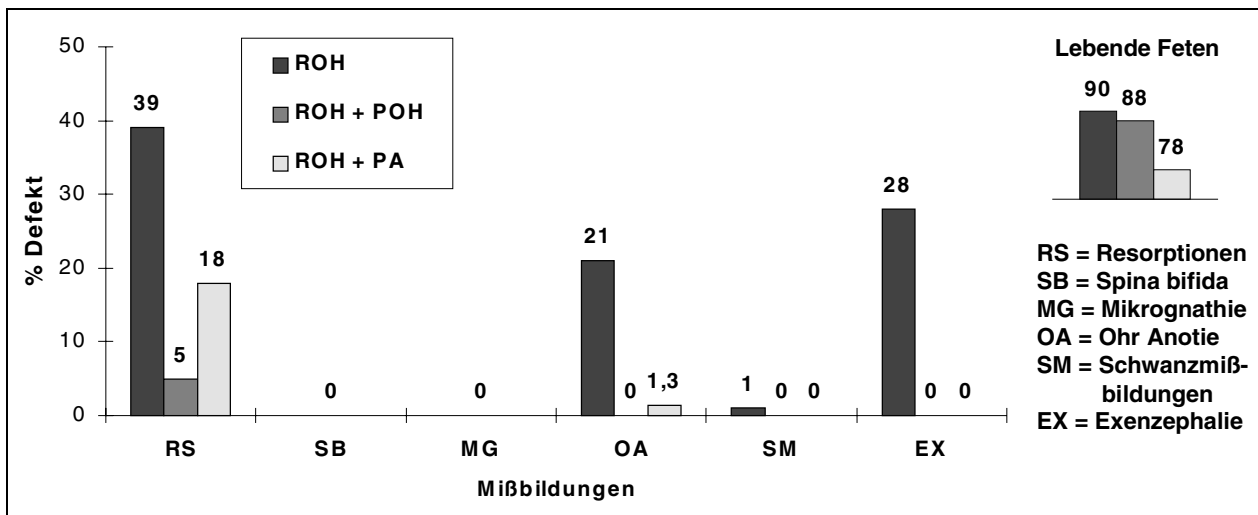


Abbildung 4.26: Teratogene Effekte in der Maus nach oraler Gabe von Retinol (ROH, 50mg/kg KG) allein oder nach gleichzeitiger Gabe von Phytol (POH, 500 mg/kg KG) bzw. Phytansäure (PA, 100 mg/kg KG) an GD 8,25.

### 4.4.4.2 Plasmakinetik in nichtträchtigen Mäusen

Nach Gabe von ROH waren im Plasma die unpolaren Retinoide Retinol, Retinylpalmitat/-oleat, Retinylstearat und Retinylinoleat die dominanten Metaboliten. Ein oxidativer Metabolismus von ROH zeigte sich außerdem am Auftreten der Retinsäure-Isomere *all-trans*-RA, *9-cis*-RA und *13-cis*-RA. Der weitere Metabolismus dieser Retinoide führte zur Bildung von *all-trans*-4-oxo-RA und *all-trans*-RAG. Außerdem wurden die *retro*-Retinoide Anhydroretinol (AR) und 14-hydroxy-4,14-*retro*-Retinol (14-HRR) detektiert. Die Kinetik von Retinol im Plasma nach Behandlung der Mäuse mit ROH allein oder zusammen mit POH bzw. PA ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Nach Gabe von ROH stieg Retinol im Plasma auf mehr als das 10-fache ( $C_{\max}$   $2045 \pm 609$  ng/ml,  $n=3$ ) der endogenen Konzentration an und wurde dann langsam eliminiert.

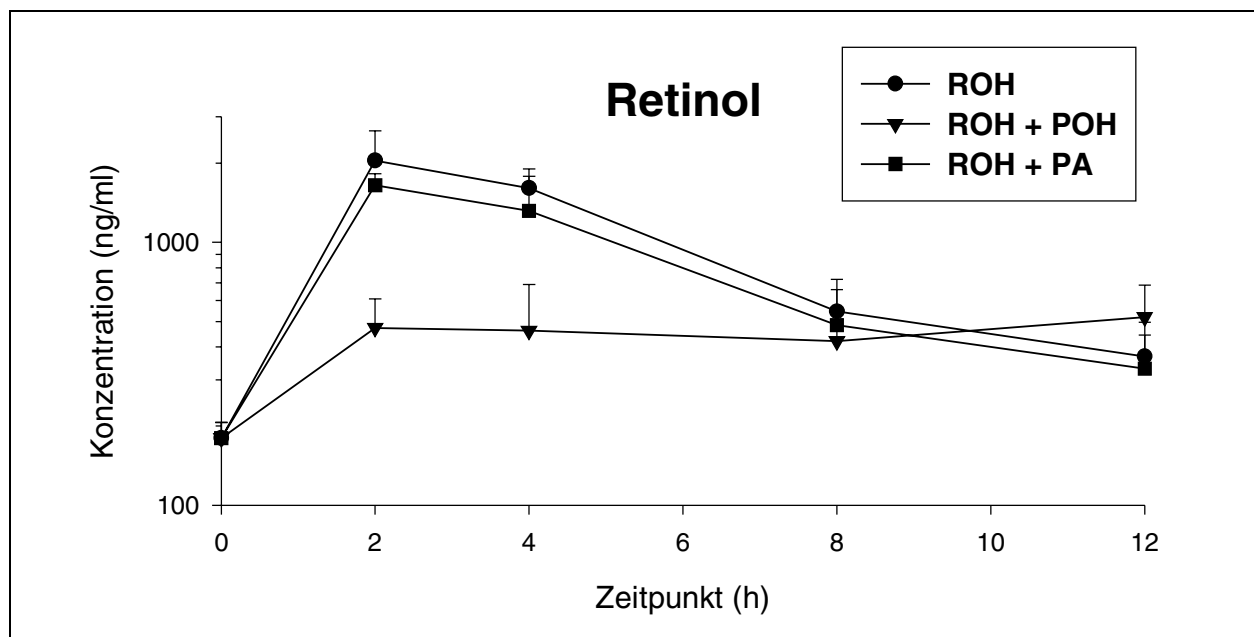


Abbildung 4.27: Plasmakinetik von Retinol in nichtträchtigen Mäusen nach Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA (n=3 pro Zeitpunkt und Gruppe).

Bei gleichzeitiger Applikation von PA zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, wenn auch bei etwas geringeren Konzentrationen ( $C_{\max}$   $1648 \pm 177$  ng/ml). Die simultane Gabe von ROH und POH veränderte die Plasmakinetik von Retinol. Zunächst stiegen die Retinolspiegel innerhalb von 2 h lediglich auf das Doppelte der endogenen Werte an ( $C_{\max}$   $519 \pm 167$  ng/ml) und hielten sich dann in diesem Konzentrationsbereich. 12 h nach Behandlung waren die Retinolspiegel bei gleichzeitiger POH-Gabe etwas höher als nach Gabe von ROH allein. Der Einfluß von PA bzw. POH auf die Plasmaspiegel an Retinylestern stellte sich ähnlich dar. In Tabelle 4.11 sind die  $C_{\max}$ - und die  $AUC_{0-12h}$ -Werte von Retinol und den auftretenden Retinylestern zusammengefaßt.  $C_{\max}$  für Retinol nach Gabe von ROH und POH war im Vergleich zu  $C_{\max}$  nach alleiniger ROH-Gabe signifikant niedriger ( $P < 0,01$ ; Student's t-test).

## 4 - Ergebnisse

<b>C<sub>max</sub> (ng/ml)</b>			
<b>Retinoid</b>	<b>ROH</b>	<b>ROH + POH</b>	<b>ROH + PA</b>
Retinol	2045 ± 609	<b>519,0 ± 167,1**</b>	1648 ± 177
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	14680 ± 3289	<b>4777 ± 985**</b>	<b>8273 ± 2104*</b>
Retinylstearat (18:0)	7340 ± 1447	<b>2746 ± 602**</b>	5429 ± 1472
Retinyl linoleat (18:2)	2277 ± 545	<b>538,5 ± 139,1**</b>	1456 ± 522
AR	76,5 ± 22,7	58,3 ± 16,9	181,7 ± 18,7
<b>AUC<sub>0-12h</sub> (ng•h/ml)</b>			
<b>Retinoid</b>	<b>ROH</b>	<b>ROH + POH</b>	<b>ROH + PA</b>
Retinol	12015 ± 2370	<b>5227 ± 1644*</b>	10028 ± 3407
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	70259 ± 25566	30764 ± 7040	48682 ± 8790
Retinylstearat (18:0)	36445 ± 10990	<b>16685 ± 3543*</b>	34200 ± 5615
Retinyl linoleat (18:2)	6601 ± 2437	2977 ± 756	4707 ± 1389

(Signifikant geringer als Werte nach ROH-Gabe; \* P<0,05; \*\* P<0,01; Student`s t-test)

Tabelle 4.11: C<sub>max</sub>- und AUC<sub>0-12h</sub>-Werte für unpolare Retinoide in Mausplasma nach Gabe von ROH allein bzw. mit POH oder PA (n=3 pro Gruppe).

Auch die C<sub>max</sub>-Werte für die Retinylester waren signifikant erniedrigt (P<0,01; Student`s t-test). Dieser Unterschied spiegelte sich auch in den AUC-Werten wieder, die im Falle von Retinol und Retinylstearat signifikant kleiner waren (P<0,05; Student`s t-test). Nach gleichzeitiger Gabe von ROH und PA war mit Ausnahme des C<sub>max</sub>-Wertes von Retinylpalmitat/-oleat (P<0,05; Student`s t-test) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur ROH-Gabe zu erkennen. Die C<sub>max</sub>-Werte der polaren Retinoid-Metaboliten sind in Tabelle 4.12 zusammengefaßt. Da diese Metaboliten nicht zu allen Zeitpunkten detektierbar waren, wurden AUC-Werte nur für all-*trans*-RA berechnet (s. Abbildung 4.28). Nach alleiniger ROH-Gabe wurden C<sub>max</sub>-Werte von 1018 ± 311 ng/ml für all-*trans*-RA bestimmt. Bei gleichzeitiger POH-Gabe konnte all-*trans*-RA nur in einer Plasmaprobe detektiert werden (10,5 ng/ml). Auch die übrigen polaren Retinoid-Metaboliten

## 4 - Ergebnisse

traten in geringeren Konzentrationen auf (13-*cis*-RA, all-*trans*-RAG) oder waren überhaupt nicht mehr detektierbar (all-*trans*-4-oxo-RA, 9-*cis*-RA).

Retinoid	C <sub>max</sub> (ng/ml)		
	ROH	ROH + POH	ROH + PA
All- <i>trans</i> -RA	1018 ± 311	<b>10,5 (n=1)**</b>	508,0 ± 402,1
13- <i>cis</i> -RA	214,5 ± 28,7	<b>18,3 ± 2,1**</b>	87,8 ± 38,4
9- <i>cis</i> -RA	29,0 ± 9,7	<b>n.d.**</b>	9,2 ± 2,5
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	194,9 ± 62,5	<b>n.d.**</b>	164,5 ± 113,6
All- <i>trans</i> -RAG	102,9 ± 9,5	42,3 ± 10,1	96,2 ± 67,7
14-HRR	86,7 ± 9,4	57,0 ± 20,7	76,5 ± 8,4

(Signifikant geringer als Werte nach ROH-Gabe, \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; Student's t-test)

Tabelle 4.12: C<sub>max</sub>-Werte für polare Retinoide in Mausplasma nach Gabe von ROH allein bzw. mit POH oder PA (n=3 pro Gruppe)

Die gleichzeitige Gabe von PA führte zwar zu einem geringeren C<sub>max</sub>-Wert für all-*trans*-RA (508,0 ± 402,1 ng/ml), der Unterschied erwies sich jedoch aufgrund der großen Standardabweichung als nicht signifikant. Nur die C<sub>max</sub>-Werte für 13-*cis*-RA und 9-*cis*-RA waren signifikant geringer. Die zusätzliche Gabe von POH führte zu einer drastischen Reduktion der Plasmaspiegel von Retinol, zu einer verminderten Bildung des aktiven Metaboliten all-*trans*-RA sowie im weiteren Verlauf zu einer verminderten Bildung des Phase-I-Metaboliten all-*trans*-4-oxo-RA. Nach Gabe von ROH und PA war zwar ein geringer Unterschied im Vergleich zum C<sub>max</sub>-Wert nach alleiniger Gabe von ROH erkennbar, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In Abbildung 4.28 sind die Plasmakinetiken für all-*trans*-RA vergleichend gegenübergestellt. Der Einfluß der gleichzeitigen Gabe von POH auf die Kinetik von all-*trans*-RA zeigte sich sehr deutlich am berechneten AUC-Wert. Auch nach Gabe von ROH und PA war der AUC-Wert für all-*trans*-RA geringer.

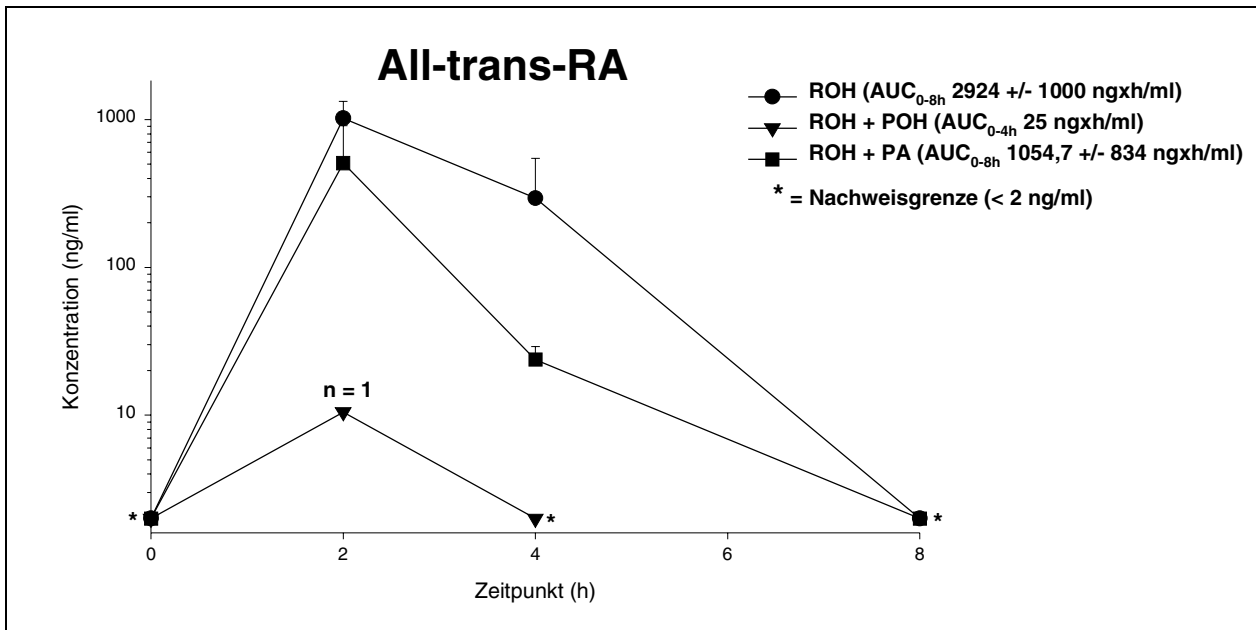


Abbildung 4.28: Vergleich der Plasmakinetiken von all-trans-RA in nichtträchtigen Mäusen nach Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA (n=3 pro Gruppe).

### 4.4.4.3 Maternale und embryonale Exposition

Es wurden Plasmaproben und Embryonen von Mäusen (n=4 pro Gruppe) 8 h nach Verabreichung von ROH allein oder zusammen mit POH bzw. PA auf Retinoide analysiert. Abbildung 4.29 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm einer embryonalen Probe. In Tabelle 4.13 sind die Konzentrationen der identifizierten Retinoide zusammengefasst. In maternalem Plasma sowie in embryonalem Gewebe kamen die unpolaren Retinylester Retinylpalmitat/-oleat, Retinylstearat und Retinylinoleat in sehr hohen Konzentrationen vor. Auch die Retinolspiegel waren im Vergleich zu den Kontrollwerten deutlich erhöht. Bei gleichzeitiger Applikation von POH waren die Konzentrationen dieser Metaboliten im Plasma nicht signifikant niedriger. Im Embryo hingegen traten diese Metaboliten in signifikant geringeren Konzentrationen auf. Nach gleichzeitiger Gabe von ROH und PA waren die Konzentrationen der unpolaren Metaboliten in beiden Kompartimenten etwas erniedrigt (nicht signifikant). In maternalem Plasma war nach 8 h keine all-trans-RA (Nachweisgrenze 2 ng/ml) detektierbar, in embryonalen Geweben trat all-trans-RA in geringen Mengen auf. Bei gleichzeitiger Gabe von POH oder PA waren zu diesem späten Zeitpunkt der Probenahme die all-trans-RA-Spiegel im Vergleich zur alleinigen ROH-Gabe nicht geringer.

## 4 - Ergebnisse

<b>C<sub>8h</sub> Plasma (ng/ml)</b>			
<b>Retinoid</b>	<b>ROH</b>	<b>ROH + POH</b>	<b>ROH + PA</b>
Retinol	358,6 ± 94,6	268,0 ± 43,1	441,9 ± 83,9
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	4545 ± 1830	2803 ± 689	3666 ± 1197
Retinylstearat (18:0)	3781 ± 1333	2168 ± 557	3325 ± 979
Retinylloleat (18:2)	503,7 ± 305,3	226,0 ± 27,0	387,3 ± 143,0
All-trans-RA	- nicht detektierbar -		
All-trans-4-oxo-RA	42,9 ± 7,5	<b>28,6 ± 2,6*</b>	29,2 ± 10,5
All-trans-4-hydroxy-RA	98,4 ± 17,2	<b>45,1 ± 5,1***</b>	95,6 ± 62,7
14-HRR	44,4 ± 2,6	<b>34,7 ± 5,6*</b>	39,0 ± 5,2
AR	102,6 ± 27,8	74,4 ± 19,1	88,9 ± 21,2
<b>C<sub>8h</sub> Embryo (ng/g)</b>			
<b>Retinoid</b>	<b>ROH</b>	<b>ROH + POH</b>	<b>ROH + PA</b>
Retinol	681,9 ± 88,2	<b>414,8 ± 41,4**</b>	712,8 ± 134,2
Retinylpalmitat/oleat (16:0/18:1)	1343 ± 270	<b>387,6 ± 69,4***</b>	1064 ± 227
Retinylstearat (18:0)	412,8 ± 82,7	<b>126,6 ± 27,9***</b>	324,8 ± 79,4
Retinylloleat (18:2)	136,9 ± 27,7	<b>41,0 ± 8,6***</b>	113,4 ± 30,9
All-trans-RA	7,8 ± 1,3	11,7 ± 0,3	9,0 ± 0,5
All-trans-4-oxo-RA	7,6 ± 1,1	<b>4,3 ± 0,8**</b>	<b>5,9 ± 0,5*</b>
All-trans-4-hydroxy-RA	34,4 ± 3,1	<b>18,6 ± 1,6***</b>	30,2 ± 10,6
14-HRR	119,7 ± 13,9	<b>79,2 ± 16,4**</b>	101,3 ± 13,4
AR	16,1 ± 8,2	<b>3,8 ± 2,6*</b>	11,2 ± 2,3

(Signifikant geringer als Werte nach ROH-Gabe, \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; Student's t-test)

Tabelle 4.13: Retinoid-Konzentrationen in maternalem Plasma und embryonalem Gewebe 8 h nach Gabe von ROH allein bzw. mit POH oder PA (n=4 pro Gruppe).

## 4 - Ergebnisse

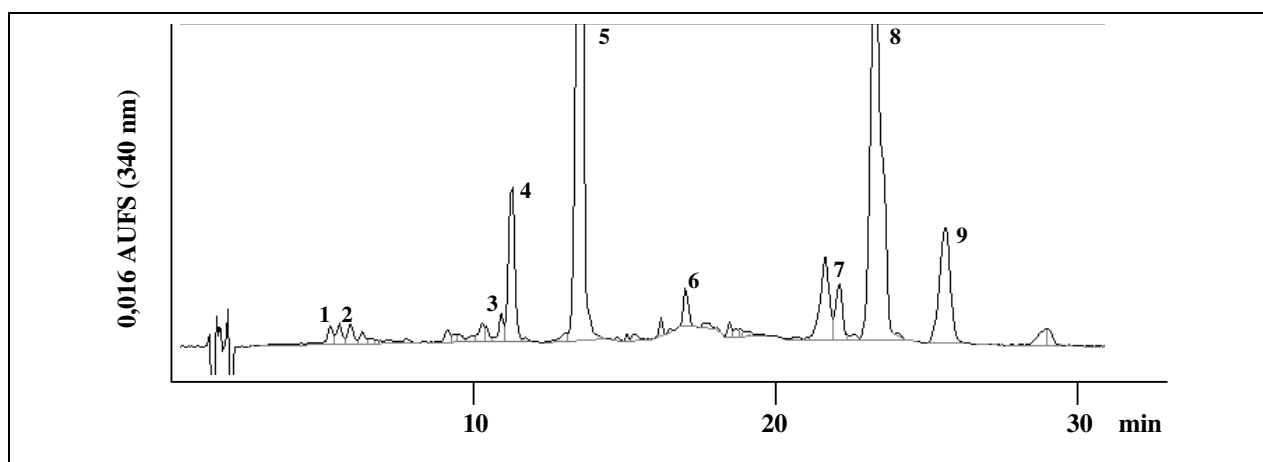


Abbildung 4.29: Chromatogramm einer embryonalen Gewebeprobe 8 h nach Gabe von ROH. 1: all-trans-4-oxo-RA, 2: all-trans-4-hydroxy-RA, 3: all-trans-RA, 4: 14-HRR, 5: Retinol, 6: AR, 7: Retinylinoat (18:2), 8: Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1), 9: Retinylstearat (18:0).

Jedoch machte sich in Bezug auf die Phase-I-Metaboliten ein Unterschied bemerkbar. Die gleichzeitige Gabe von POH, nicht aber von PA, führte zu deutlich verringerten Konzentrationen an all-trans-4-oxo-RA und all-trans-4-hydroxy-RA sowohl im Plasma als auch im Embryo. In Abbildung 4.30 ist dieser Einfluß der Gabe von Phytol auf die Retinoid-Konzentrationen in maternalem Plasma sowie embryonalem Gewebe noch einmal verdeutlicht.



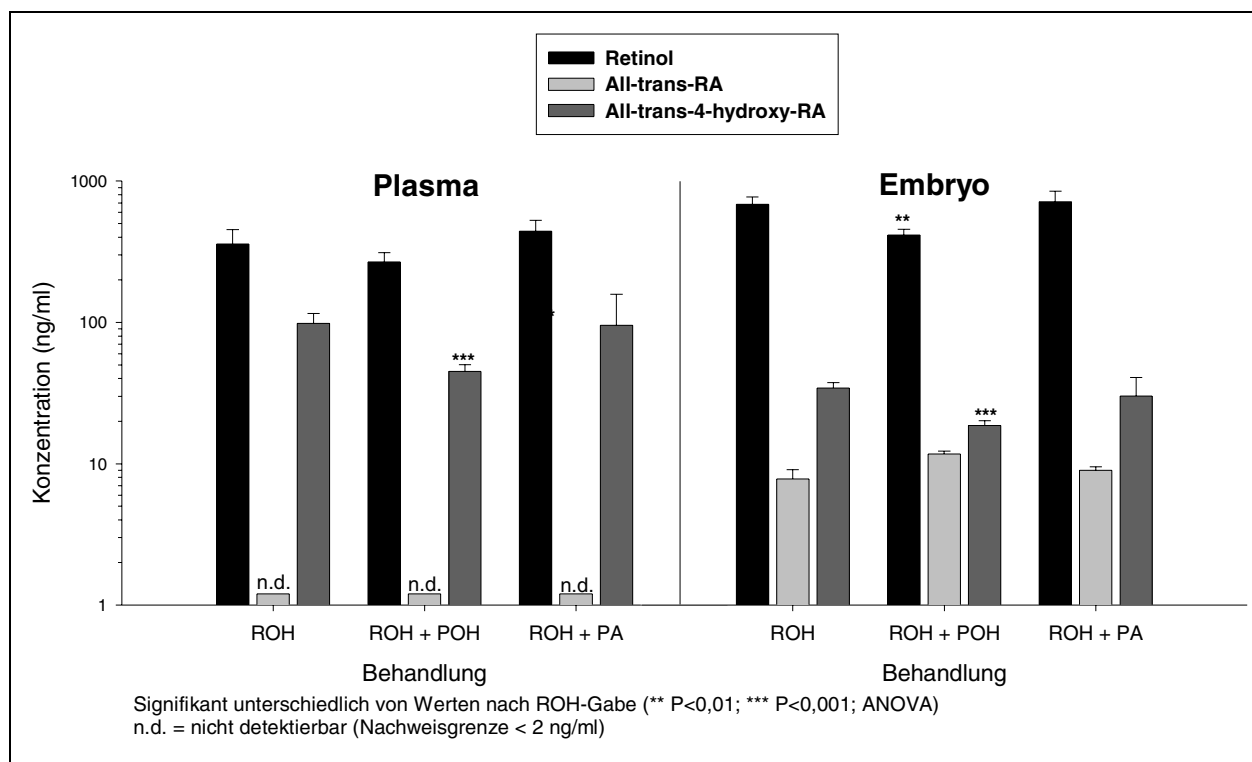


Abbildung 4.30: Vergleich der Retinoid-Konzentrationen in Plasma und Embryogewebe 8 h nach Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA.

### 4.4.5 Zusammenfassung

- Die gleichzeitige Gabe von Phytansäure oder dessen Vorläufersubstanz Phytol mit einer teratogenen Dosis *all-trans*-RA führte zu **keiner signifikanten Verstärkung** der durch *all-trans*-RA induzierten, teratogenen Effekte in der Maus. Die beobachteten Mißbildungen blieben entweder konstant oder gingen sogar leicht zurück. Die Bestimmung von Plasmakinetiken in nichtträchtigen Mäusen zeigte, daß sowohl Phytansäure als auch Phytol einen Einfluß auf die Absorption von *all-trans*-RA ausübte: Plasma- $C_{max}$ - und -AUC-Werte von *all-trans*-RA waren bei gleichzeitiger Gabe von Phytansäure oder Phytol im Vergleich zu den Werten nach alleiniger Gabe von *all-trans*-RA deutlich, wenn auch nicht signifikant, verringert. Auch der Metabolismus von *all-trans*-RA schien beeinflusst zu werden, da die Bildung des Phase-I-Metaboliten *all-trans*-4-oxo-RA sowie des Phase-II-Metaboliten *all-trans*-RAG verringert war. Die Messung von Retinoid-Konzentrationen in embryonalem Gewebe ergab, daß bei gleichzeitiger Gabe von *all-trans*-RA und Phytansäure die embryonalen Spiegel

## 4 - Ergebnisse

---

sowohl der Mutterkomponente all-*trans*-RA als auch der Folgemetaboliten im Vergleich zur alleinigen Gabe von all-*trans*-RA signifikant verringert waren.

- Die gleichzeitige Gabe von Phytansäure oder dessen Vorläufersubstanz Phytol zusammen mit einer teratogenen Dosis Retinol führte zu einer **Reduzierung** der durch Retinol induzierten, teratogenen Effekte in der Maus: Resorptionen gingen signifikant zurück, nach Retinol-Gabe auftretende Mißbildungen (Anotie, Exenzephalie) wurden nicht mehr beobachtet. Die Bestimmung von Plasmakinetiken in nichtträchtigen Mäusen zeigte, daß Phytol einen erheblichen Einfluß auf die Absorption von Retinol ausübte: Plasma- $C_{\max}$ - und -AUC-Werte von Retinol und Retinylestern waren bei gleichzeitiger Gabe von Phytol (teilweise signifikant) reduziert, die Plasmakinetik von Retinol (s. Abbildung 4.27) war deutlich verändert. Diese Veränderungen wirkten sich auch auf embryonale Spiegel von Retinol und Retinylestern aus, die bei gleichzeitiger Phytol-Gabe signifikant geringer waren. Weiterhin war der oxidative Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA nahezu vollständig blockiert (s. Abbildung 4.28), nur in einer Plasmaprobe konnte all-*trans*-RA nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Gabe von Phytansäure war nur ein marginaler Einfluß auf die Absorption von Retinol zu erkennen. Dennoch war auch in diesem Fall der oxidative Metabolismus zu all-*trans*-RA (AUC  $1054,7 \pm 834$  ng\*h/ml) geringer als nach alleiniger Retinol-Gabe (AUC  $2923,8 \pm 1000$  ng\*h/ml ).

### 4.5 Vergleich von HPLC-UV- mit HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>-Detektion

Um die Empfindlichkeit des HPLC-Systems mit Diodenarray- (DAD-) und MS<sup>n</sup>-Detektion gegenüber bereits bestehenden HPLC-Methoden mit UV-Detektion vergleichen zu können, wurde ein Retinsäure-Standardgemisch unter identischen Bedingungen an dem HPLC-UV- und dem HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>-System analysiert. Der Standard enthielt je 100 pg 13-*cis*-RA (1), 9-*cis*-RA (2) und all-*trans*-RA (3) und wurde unter Anwendung des Fließmittel-Gradienten von HPLC-Methode I (s. 3.8.2.1) chromatographiert. In Abbildung 4.31 sind die DAD-Spur des neuen Systems und die UV-Spur des bisher verwendeten HPLC-Systems bei einer Wellenlänge von 340 nm vergleichend gegenübergestellt. Bei der DAD-Spur konnte ein Signal-Rausch-Verhältnis von 6:1 bis 9:1 ermittelt werden. Die UV-Spur des bisher verwendeten Systems zeigte ein Signal-Rausch-Verhältnis von 4:1 bis 7:1, allerdings führte die aufgrund des größeren Totvolumens hervorgerufene Verschiebung der Retentionszeiten in diesem HPLC-System um ca. 2 min zu breiteren und niedrigeren Peakformen.

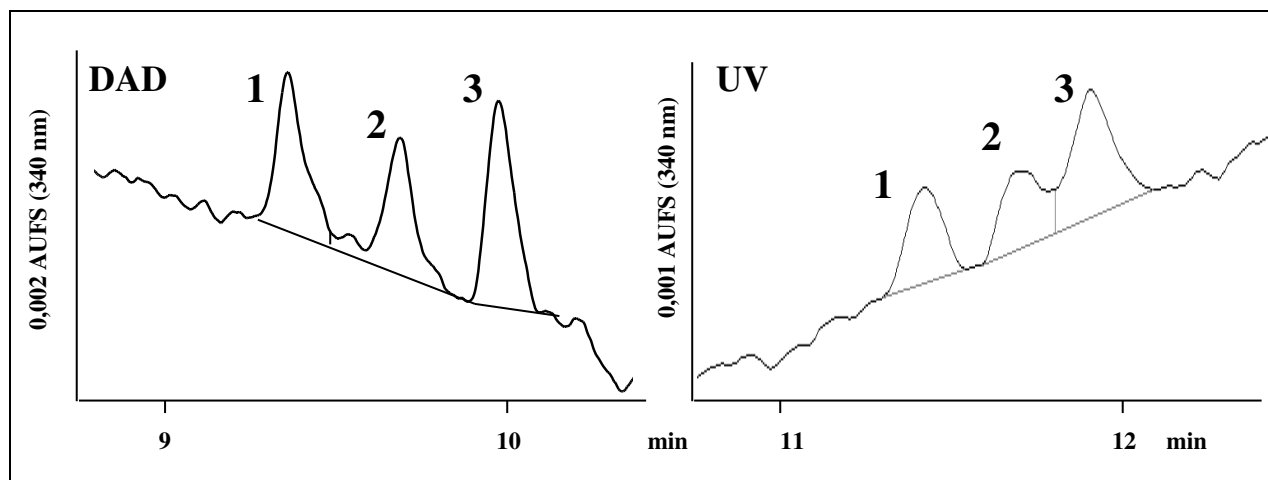


Abbildung 4.31: Vergleich der Signalstärken (340 nm) eines Gemisches aus RA-Isomeren (1: 13-*cis*-RA, 2: 9-*cis*-RA, 3: all-*trans*-RA; je 100 pg) chromatographiert am HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>- bzw. am HPLC-UV-System.

In Abbildung 4.32 sind ein MS- bzw. ein MS-MS-Lauf (Positiv-Ionen-Modus) desselben Standards dargestellt. Die Läufe wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Das Signal-Rausch-Verhältnis der MS-Spur betrug 7-10:1. Bei der MS-MS-Spur wurden die Signale der drei stärksten Fragmentationen von  $m/z$  301 ( $m/z$  201, 205 und 255) aufaddiert. Die Struktur der

## 4 - Ergebnisse

Fragmentationen konnte nicht geklärt werden. Gegenüber der MS-Spur ergab sich ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis von 15-20:1.

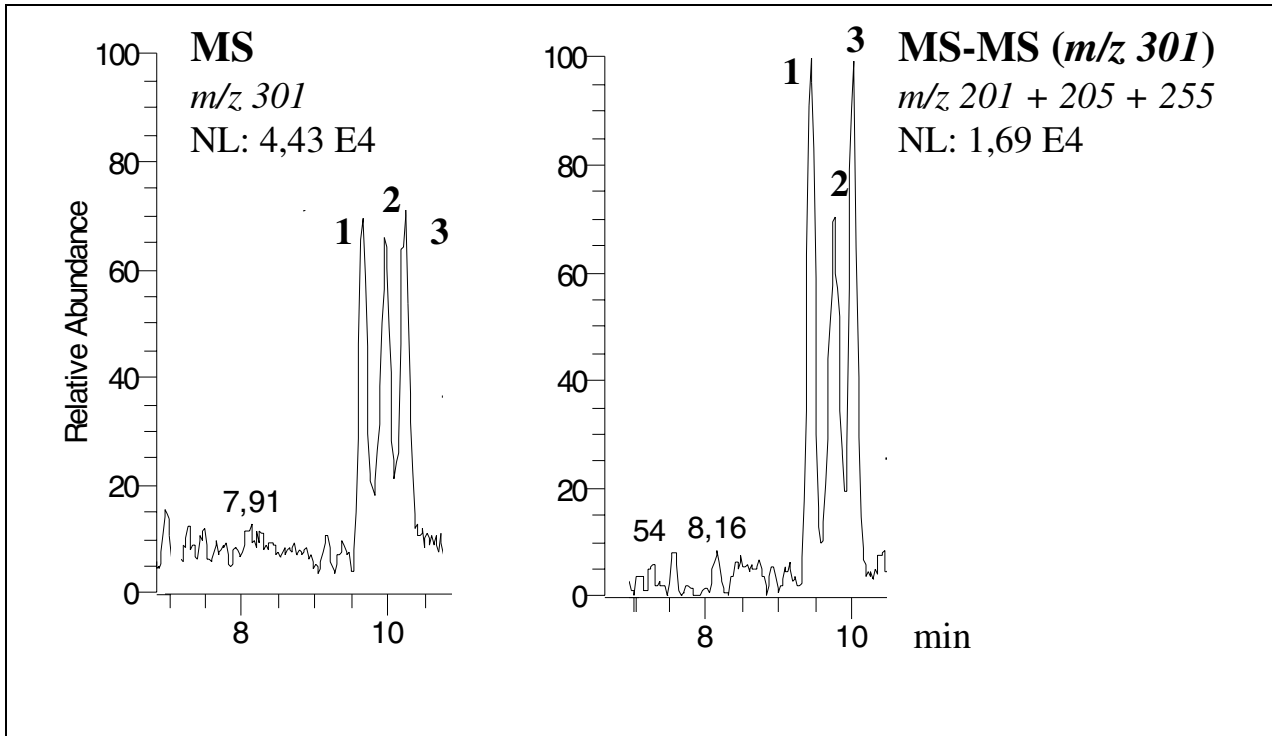


Abbildung 4.32: Relative Signalstärken eines Gemisches aus RA-Isomeren (1: 13-*cis*-RA, 2: 9-*cis*-RA, 3: all-*trans*-RA; je 100 pg) nach chromatographischer Trennung und APCI-MS von  $m/z$  301 (=  $[M+H]^+$ ) bzw. MS-MS von  $m/z$  301 und Detektion der Fragmentionen  $m/z$  201, 205 und 255 (in zwei unabhängig voneinander durchgeführten HPLC-Läufen).

### 4.6 Identifizierung von all-*trans*-4-hydroxy-RA als embryonalen Metaboliten

Bei den in Abschnitt 4.4 beschriebenen Experimenten trat nach Gabe von all-*trans*-RA an trächtige Mäuse sowohl in maternalem Plasma als auch in embryonalem Gewebe ein Peak auf (Peak B, Abbildung 4.33), der mit den Referenzsubstanzen von 13-*cis*-4-oxo-RA und all-*trans*-4-hydroxy-RA koeluierte. Es stellte sich heraus, daß das Verhältnis der Signalflächen bei den beiden Detektionswellenlängen ( $FE_{340nm}/FE_{356nm}$ ; s. 3.7.5) des auftretenden Peaks dem der Referenz-substanz von all-*trans*-4-hydroxy-RA entsprach. Da all-*trans*-4-hydroxy-RA als *in vivo*-Metabolit von all-*trans*-RA in der Maus noch nicht beschrieben wurde und nicht auszuschließen

## 4 - Ergebnisse

war, daß unter diesem Peak zusätzlich 13-*cis*-4-oxo-RA lag, wurden gesammelte Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS-MS analysiert.

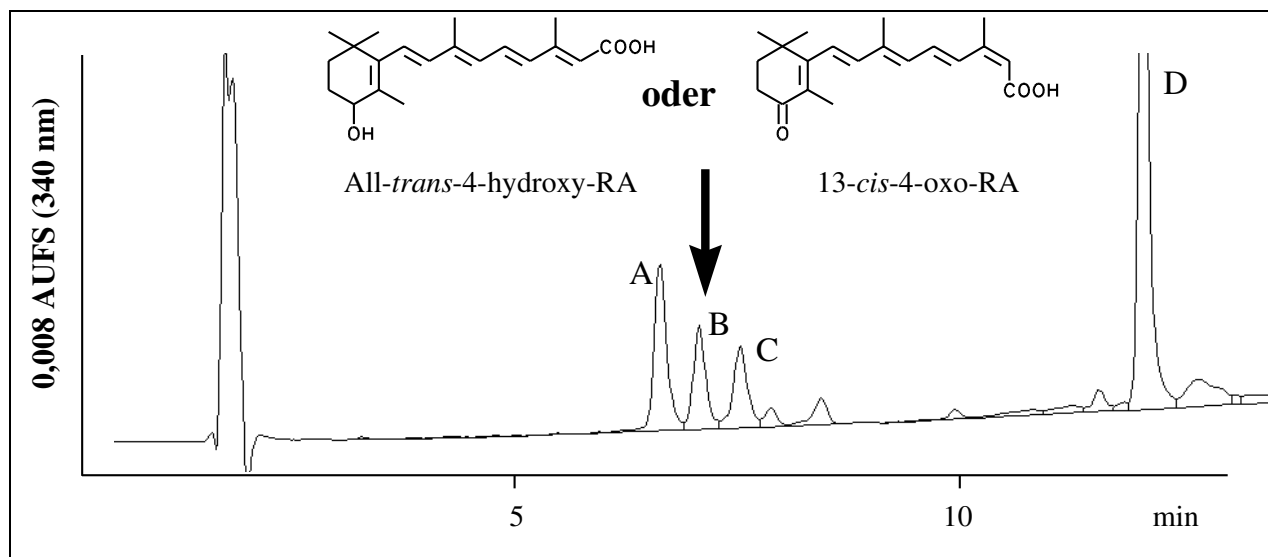


Abbildung 4.33: Chromatogramm einer embryonalen Gewebeprobe 4 h nach Behandlung einer trächtigen Maus mit RA, analysiert mittels HPLC-Methode II/Probenvorbereitung B. A: all-trans-4-oxo-RA, B: all-trans-4-hydroxy-RA/13-*cis*-4-oxo-RA, C: unbekannt, D: all-trans-RA. Peak B wurde zur weiteren Identifizierung mittels HPLC-DAD-MS-MS gesammelt.

Zunächst wurden die Referenzsubstanzen in einer Konzentration von 1000 ng/ml mit einem Fluß von 5 µl/min über die Spritzenpumpe gefördert, um MS- und MS-MS-Spektren zu erstellen. Über die HPLC-Pumpen wurde zusätzlich Fließmittel mit einem Fluß von 0,7 ml/min gefördert. Die Zusammensetzung des Fließmittels entsprach den HPLC-Bedingungen der Methode VI (s. 3.7.5.6) zum Zeitpunkt der Elution der zu detektierenden Komponente. Da das Fließmittel Ammoniumacetat enthielt, wurde die chemische Ionisierung ohne weitere Zusätze ermöglicht.

## 4 - Ergebnisse

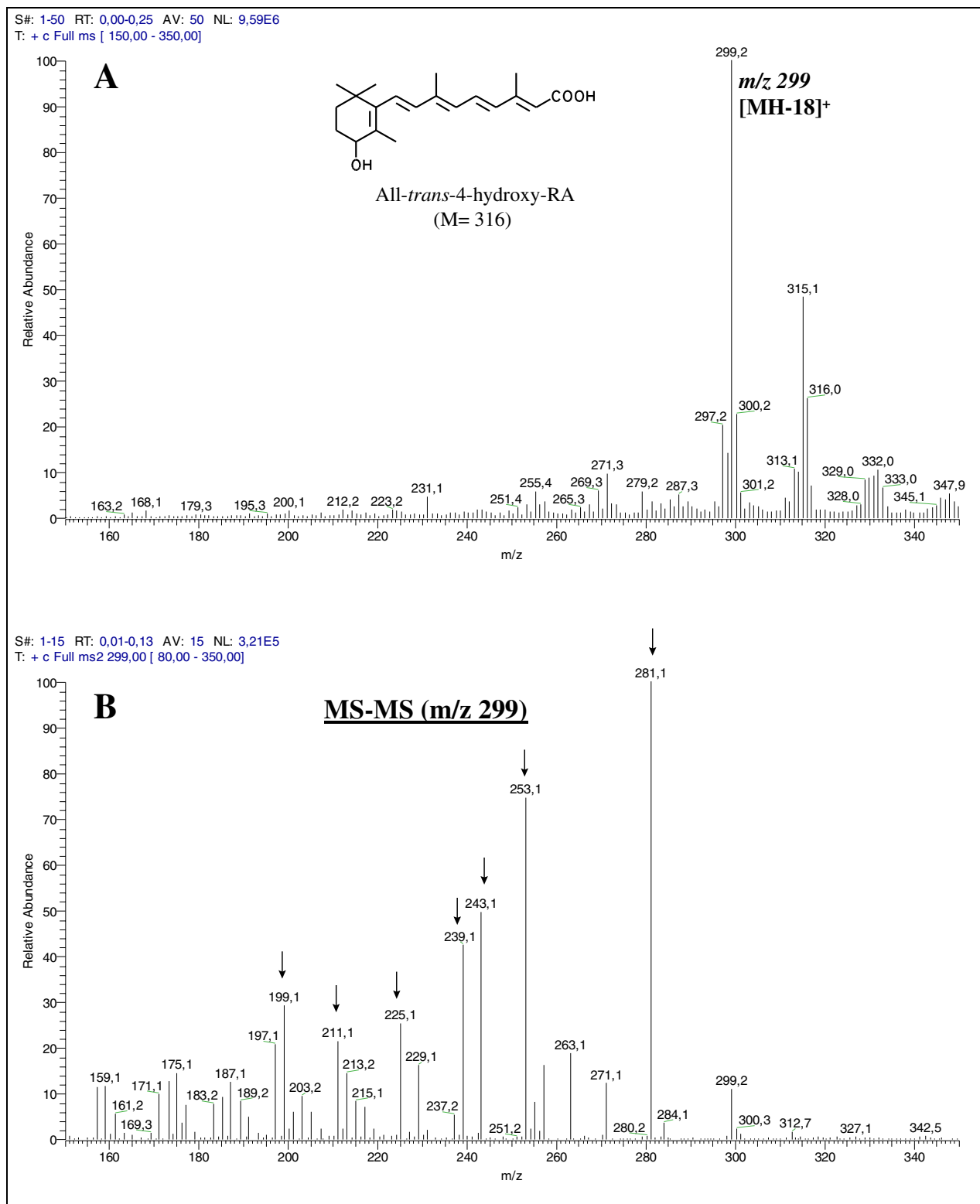


Abbildung 4.34: MS-Spektrum (oben) und MS-MS-Spektrum (unten) des Molekülpeaks  $m/z$  299 von all-trans-4-hydroxy-RA nach Injektion eines ethanolischen Standards über die Spritzenpumpe (1000 ng/ml; 5  $\mu$ l/min) und Zugabe von Fließmittel (Elutionsbedingungen HPLC-Methode VI; 0,7 ml/min).

## 4 - Ergebnisse

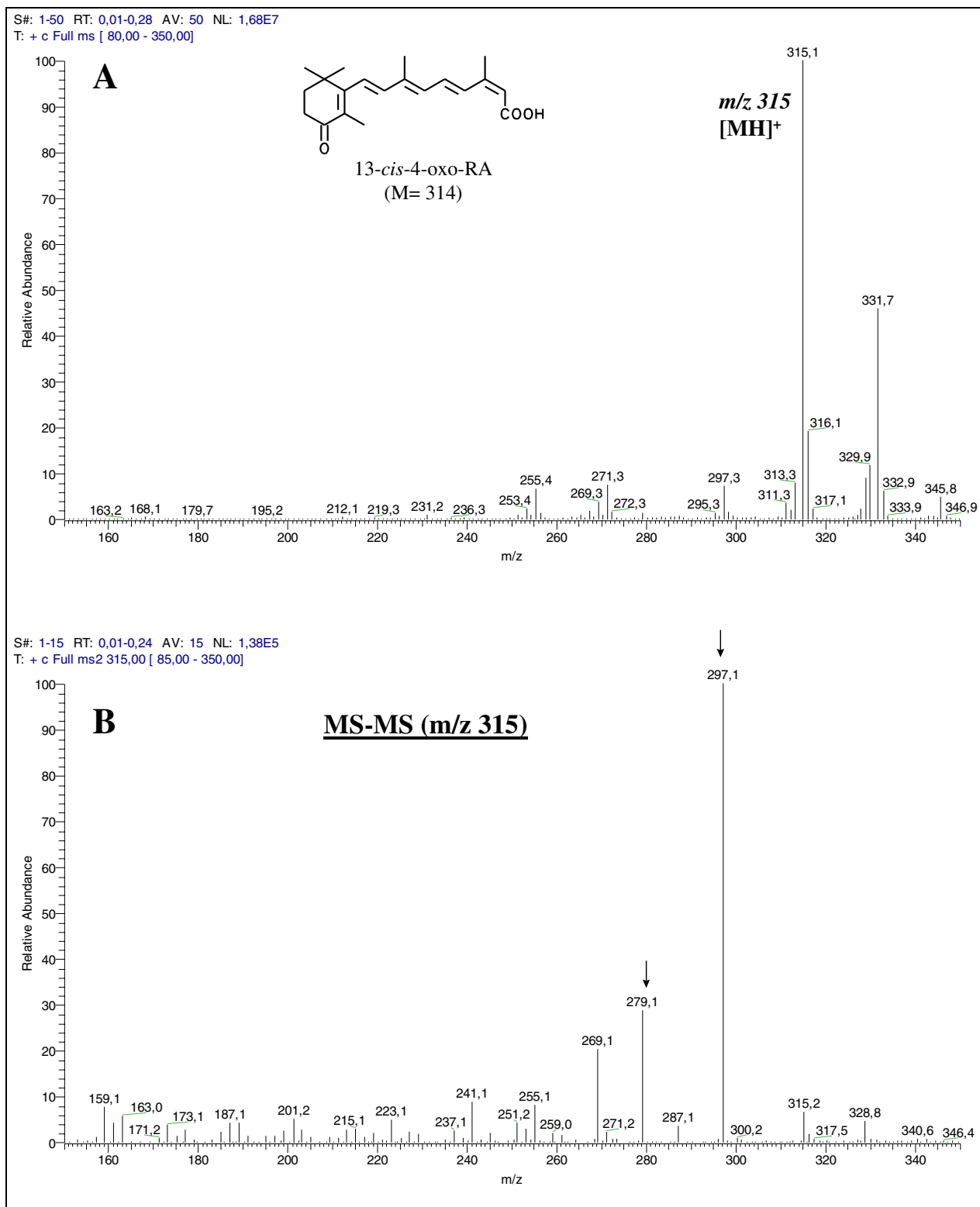


Abbildung 4.35: MS-Spektrum (oben) und MS-MS-Spektrum des Molekülpeaks m/z 315 (unten) von 13-cis-4-oxo-RA nach Injektion eines ethanolischen Standards über die Spritzenpumpe (1000 ng/ml; 5 µl/min) und Zugabe von Fließmittel (Elutionsbedingungen HPLC-Methode VI; 0,7 ml/min).

## 4 - Ergebnisse

---

In Abbildung 4.34 ist das MS- (A) und das MS-MS-Spektrum (B) von all-*trans*-4-hydroxy-RA dargestellt. Das Ion  $m/z$  299 stellte den Basispeak der Substanz dar und entsprach einer Wasserabspaltung der protonierten Verbindung. Die weitere Fragmentierung dieser Ionen führte zu einer Vielzahl von Ionen, von denen die mit  $m/z$  281, 253, 243, 239, 225, 211 und 199 ausgewählt wurden, weil sie das beste Signal-Rausch-Verhältnis aufwiesen. Das Fragmention  $m/z$  281 entstand durch eine weitere Wasserabspaltung, die Struktur der anderen Fragmentionen konnte nicht aufgeklärt werden. In Abbildung 4.35 ist das MS- (A) und das MS-MS-Spektrum (B) von 13-*cis*-4-oxo-RA dargestellt. Der Basispeak von  $m/z$  315 entsprach der protonierten Komponente. MS-MS dieses Ions führte zu einer geringeren Anzahl von Fragmenten als bei all-*trans*-4-hydroxy-RA. Als charakteristische MS-MS-Fragmente wurden die Ionen  $m/z$  297 und  $m/z$  279 ausgewählt, die jeweils durch Wasserabspaltungen entstanden.

Die anschließende Rechromatographie des aufgefangenen und aufgereinigten Peaks aus embryonalem Gewebe mittels HPLC-MS-MS (Abbildung 4.36) zeigte im Vergleich zu einem all-*trans*-4-hydroxy-RA-Standard sehr gute Übereinstimmungen bezüglich der Retentionszeit und der Signale der ausgewählten Massenfragmente. Auch das Verhältnis der Signale zueinander war nahezu identisch. Im Gegensatz dazu konnte bei einer weiteren Analyse des Peaks und Fragmentierung des Basispeaks für 13-*cis*-4-oxo-RA (s. Abbildung 4.37) an der Stelle, an der die Referenzsubstanz eluierte (s. Pfeilmarkierung), kein Signal erhalten werden.



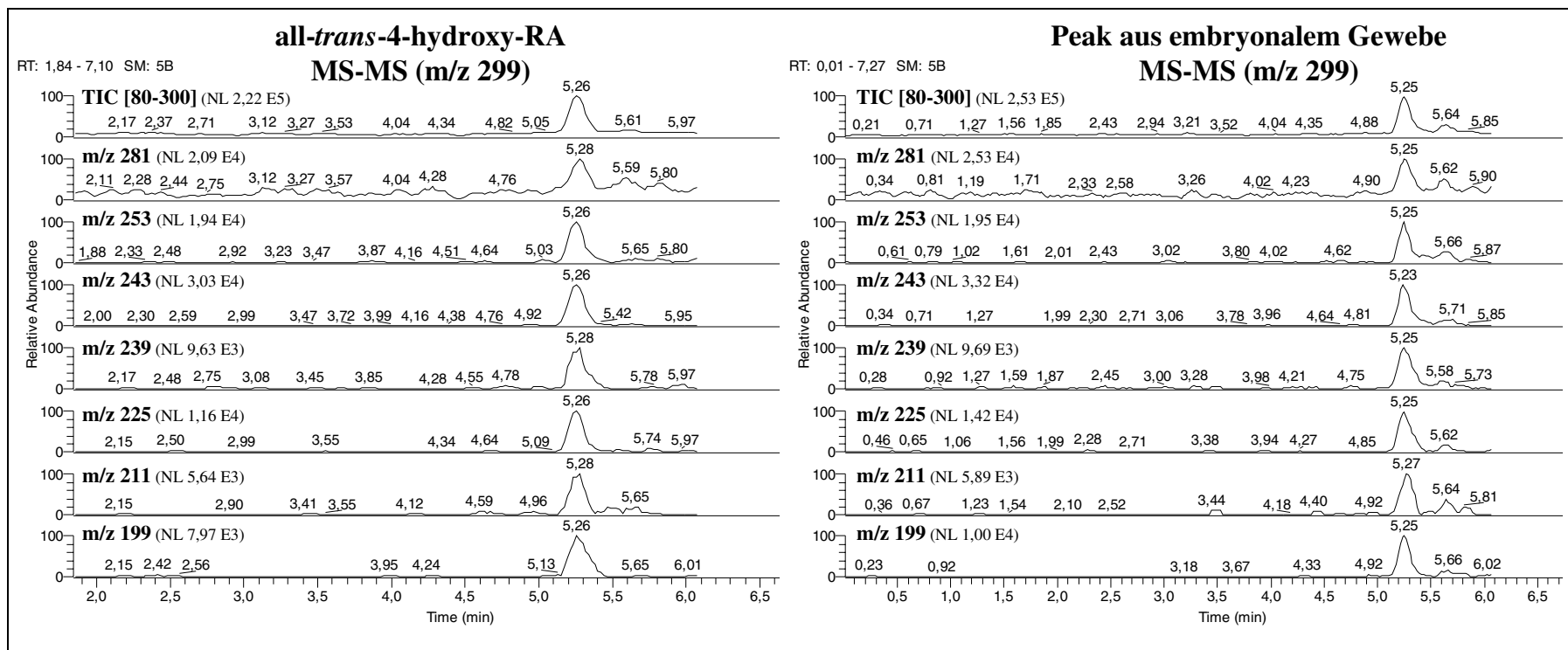


Abbildung 4.36: MS-MS-Spuren ausgewählter Tochterionen nach Fragmentierung des Molekülpeaks m/z 299 eines all-trans-4-hydroxy-RA-Standards und des unbekannten Peaks aus embryonalem Gewebe (Fragmentierung nach Segment 1a).

## 4 - Ergebnisse

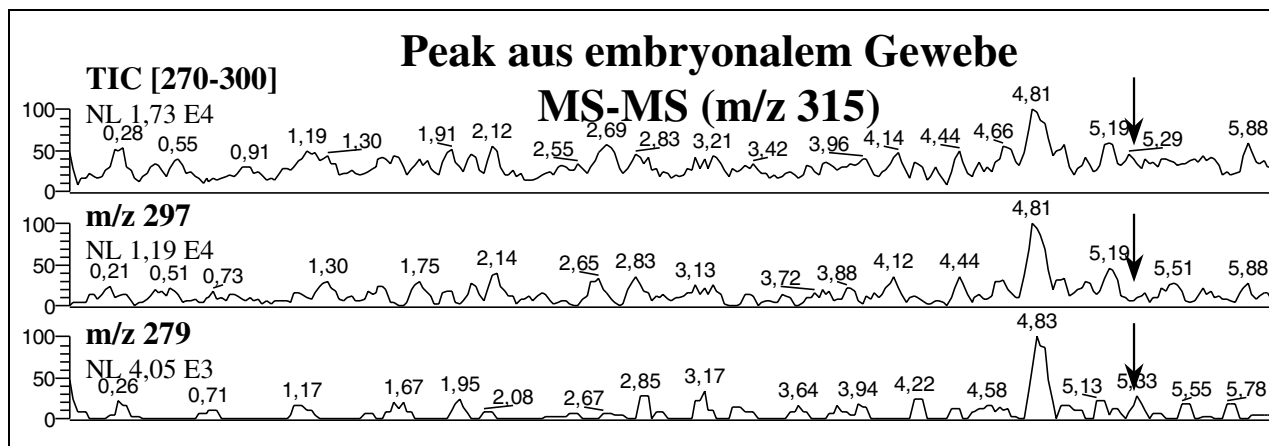


Abbildung 4.37: MS-MS-Spuren ausgewählter Tochterionen nach Fragmentierung des Molekülpeaks m/z 315 des unbekannten Peaks aus embryonalem Gewebe (Fragmentierung nach Segment 1b). Die Pfeile markieren die Elutionszeit von 13-cis-4-oxo-RA.

Das UV-Spektrum des unbekannten Peaks entsprach dem authentischer all-*trans*-4-hydroxy-RA. In beiden Fällen wurde ein Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max}$ ) bei 336 nm ermittelt (s. Abbildung 4.38). Das UV-Spektrum von 13-*cis*-4-oxo-RA zeigte ein Absorptionsmaximum bei 360 nm.

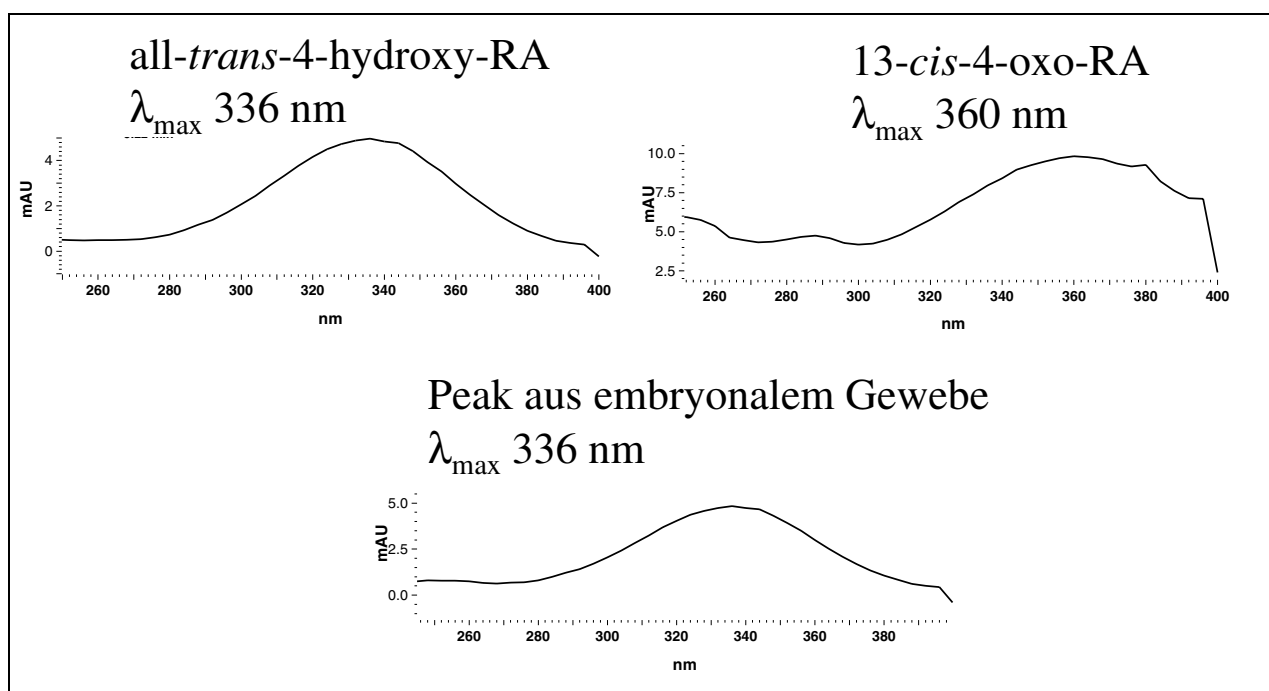


Abbildung 4.38: UV-Spektren von all-*trans*-4-hydroxy-RA, 13-*cis*-4-oxo-RA und dem mit diesen Referenzsubstanzen koelulierendem Peak aus embryonalem Gewebe.

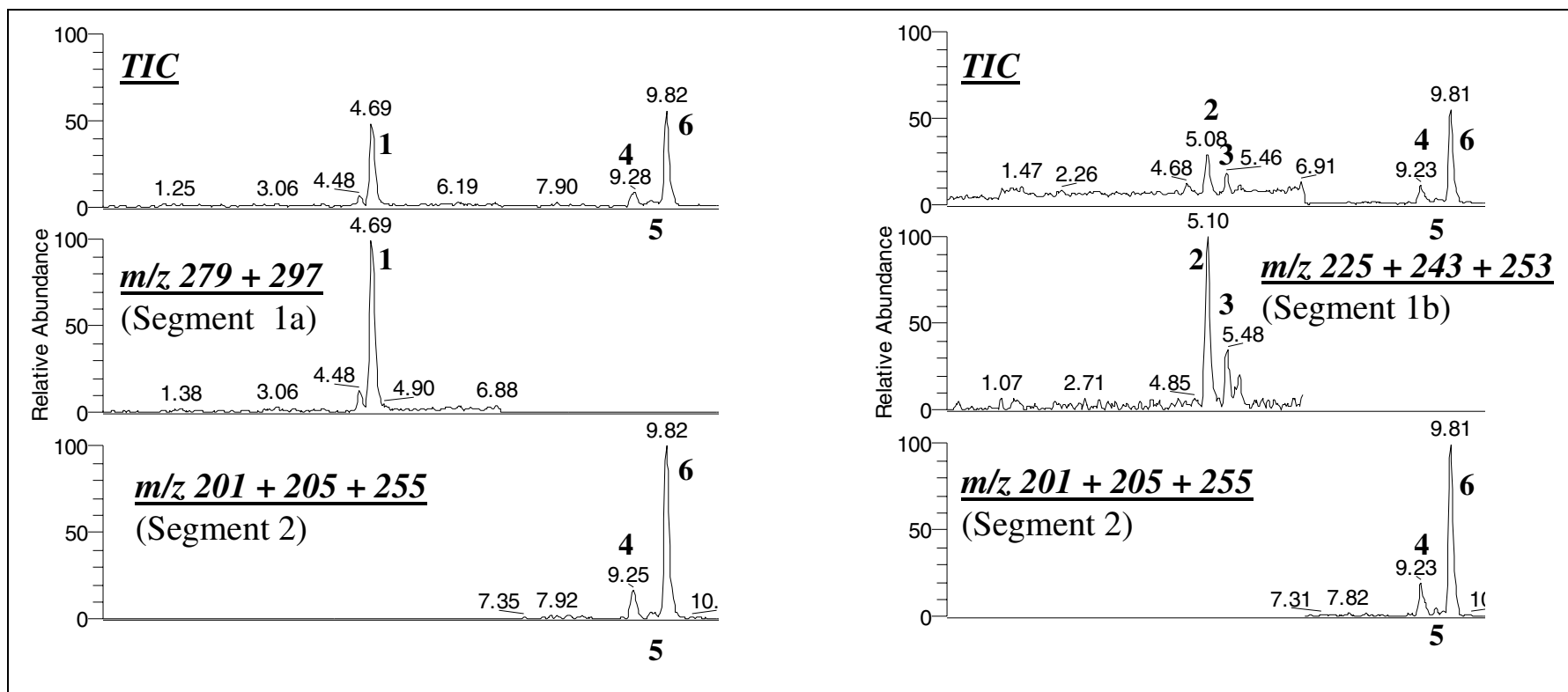


Abbildung 4.39: MS-MS-Chromatogramme einer embryonalen Gewebeprobe 4 h nach Behandlung einer trächtigen Maus mit RA (20 mg/kg KG); Fragmentierung der Molekülpeaks für 4-oxo-RA- ( $m/z$  315; Segment 1a), für 4-hydroxy-RA- ( $m/z$  299; Segment 1b) und für RA-Isomere ( $m/z$  301; Segment 2). 1: all-trans-4-oxo-RA (1,7 ng); 2: all-trans-4-hydroxy-RA (4,5 ng); 3: Stellungsisomer der all-trans-4-hydroxy-RA; 4: 13-cis-RA (1,0 ng); 5: 9-cis-RA (0,15 ng); 6: all-trans-RA (3,6 ng).

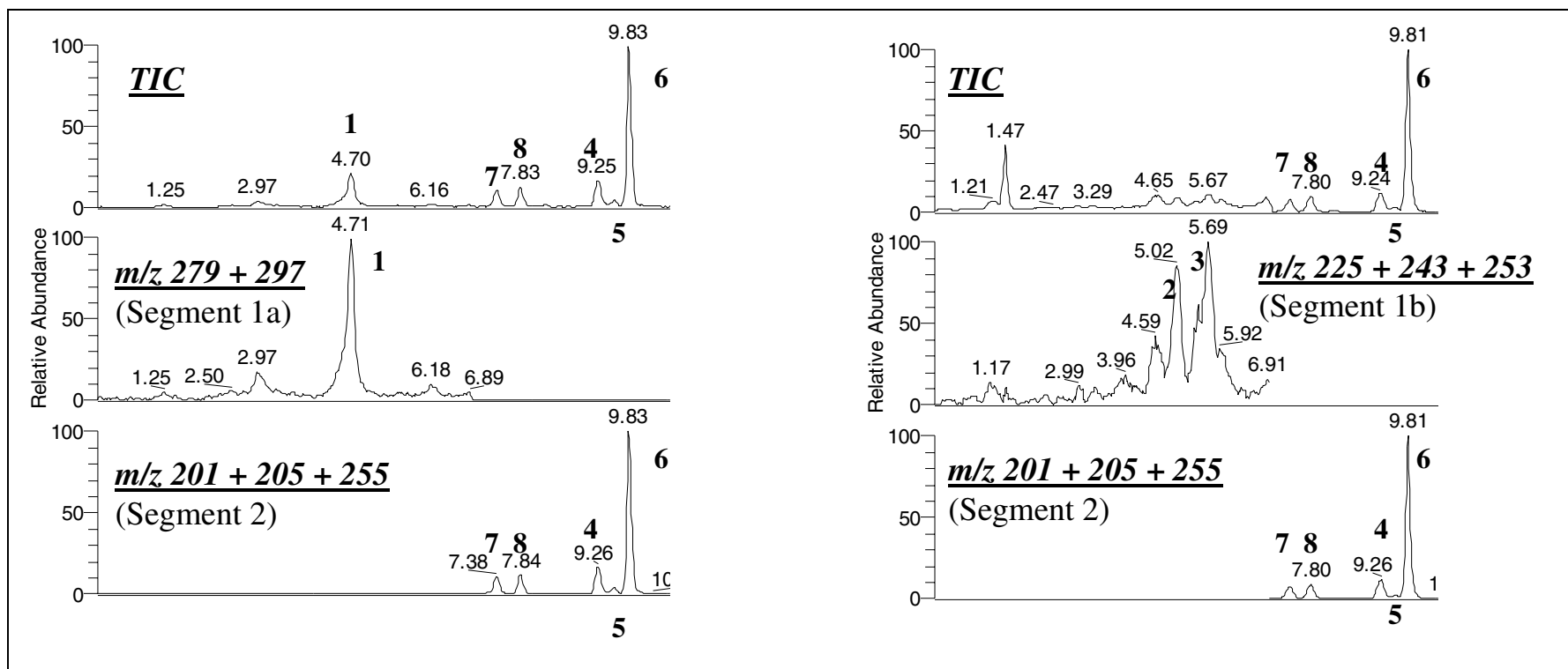


Abbildung 4.40: MS-MS-Chromatogramme einer maternalen Plasmaprobe 4 h nach Behandlung einer trächtigen Maus mit RA (20 mg/kg KG); Fragmentierung der Molekülpeaks für 4-oxo-RA- ( $m/z$  315; Segment 1a), für 4-hydroxy-RA- ( $m/z$  299; Segment 1b) und für RA-Isomere ( $m/z$  301; Segment 2). 1: all-trans-4-oxo-RA (2,7 ng); 2: all-trans-4-hydroxy-RA (1,9 ng); 3: Stellungsisomer der all-trans-4-hydroxy-RA; 4: 13-cis-RA (0,55 ng); 5: 9-cis-RA (0,03 ng); 6: all-trans-RA (4,0 ng); 7: 13-cis-RAG (1,0 ng); 8: all-trans-RAG (2,2 ng).

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, daß es sich bei dem unbekannten Metaboliten, der nach Gabe von *all-trans*-RA an trächtige Mäuse in embryonalem Gewebe detektiert wurde, um *all-trans*-4-hydroxy-RA handelt. Dieser Metabolit wurde auch in maternalem Plasma detektiert und wie oben beschrieben mittels HPLC gekoppelt mit Diodenarray- und MS-MS-Detektion identifiziert.

### 4.7 Analyse einer Plasma- und einer Gewebeprobe mittels LC-MS-MS

Wie unter 3.8.1.7 und 3.8.2.6 beschrieben, wurden eine Plasma- und eine embryonale Gewebeprobe analysiert, die 4 h nach Behandlung einer trächtigen Maus mit RA (20 mg/kg KG) entnommen wurde (Beschreibung des Experiments, s. 3.5.3). In Abbildung 4.39 sind die LC-MS-MS-Chromatogramme der embryonalen Gewebeprobe nach Fragmentierung des Massenpeaks für 4-oxo-RA- ( $m/z$  315; Segment 1a), für 4-hydroxy-RA- ( $m/z$  299; Segment 1b) und für RA-Isomere ( $m/z$  301; Segment 2) dargestellt. Da sich die Segmente 1a und 1 b zeitlich überlappten, wurde die Analyse zweimal durchgeführt. Es konnten *all-trans*-4-oxo-RA (1), *all-trans*-4-hydroxy-RA (2), 13-*cis*-RA (4), 9-*cis*-RA (5) und *all-trans*-RA (6) identifiziert werden. Ein zusätzlicher Peak (3) eluierte 0,4 min. nach *all-trans*-4-hydroxy-RA. Hierbei handelte es sich vermutlich um ein Stellungsisomer der *all-trans*-4-hydroxy-RA. Die Analyse einer maternalen Plasmaprobe führte zu einem ähnlichen Chromatogramm (s. Abbildung 4.40). Im Fragmentierungssegment für die RA-Isomere konnten zusätzlich 13-*cis*-RAG (7) und *all-trans*-RAG (8) detektiert werden. Nach APCI-MS wurden die Glukuronide offensichtlich hydrolysiert, so daß das Hauptfragment  $m/z$  301 vom Aglykon (13-*cis*- oder *all-trans*-RA) stammte.



### **5 Diskussion**

#### **5.1 Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr**

##### **5.1.1 Vitamin-A-Gehalt der Leber**

In der im Rahmen dieser Studie verwendeten Putenleber wurden unter Berücksichtigung des Wasserverlusts Vitamin-A-Gehalte von  $49 \pm 11$  mg/100 g gebratener Leber (berechnet als Retinol) ermittelt. Die Werte liegen im Bereich der durch das BgVV ermittelten Gehalte (s. Abbildung 1.13) in Schlachttierlebern deutscher Provenienz (Anonymous 1995). Auch wenn Putenleber nicht so häufig verzehrt wird, so kann man unter Berücksichtigung der Vitamin-A-Gehalte in Lebern anderer Spezies davon ausgehen, daß eine durchschnittliche Lebermahlzeit mit einer Vitamin-A-Aufnahme von 40-120 mg Retinol (= 133.333-400.000 IU Vitamin A) verbunden ist. In anderen Ländern der Europäischen Union (Niederlande, Dänemark) wurden Vitamin-A-Gehalte in Schlachttierlebern ermittelt, die tendenziell etwas geringer ausfielen (Leth 1994; Anonymous 1994). Dennoch konnte dort ebenso wie in Deutschland im Vergleich zu früheren Daten eine deutliche Zunahme des Vitamin-A-Gehaltes in Schlachttierlebern festgestellt werden. Weiterhin auffällig waren die im BgVV-Bericht aufgeführten, extrem großen Schwankungsbreiten zwischen minimalen und maximalen Vitamin-A-Gehalten. Bei den Putenleberproben dieser Studie waren die Schwankungen nicht so groß, vermutlich weil alle Lebern von Tieren eines Haltungs- und Schlachtbetriebes stammten. Fütterungsversuche mit Puten ergaben, daß große individuelle Variationen bezüglich des Vitamin-A-Gehaltes der Leber vor allem dann auftraten, wenn die Tiere neben der standardisierten Fütterung (Gelbkorn und Mehl getrockneter Kleeblätter) freien Zugang zu frischem Gras hatten (Guilbert and Hinshaw 1934). Die Autoren führten dies auf individuelle Nahrungsgewohnheiten der Tiere zurück. Eine Korrelation des Vitamin-A-Gehaltes in Lebern von Schweinen und Kälbern und der Fütterung von mit Vitamin A angereichertem Futter konnten Kessler et al. (Kessler et al. 1992) feststellen. Den Autoren zufolge wäre eine Schätzung des Vitamin-A-Gehaltes aufgrund der Vitamin-A-Aufnahme möglich. Solche Korrelationen sind auch in einer zusammenfassenden Übersicht von Landes beschrieben, jedoch nur auf eine orale Darreichungsform bezogen (Landes 1994). Bei intramuskulärer Injektion sehr hoher Vitamin-A-Mengen wurden hingegen Vitamin-A-Gehalte in der Leber gemessen, die noch unterhalb derer von Kontrolltieren lagen. Außer für grasende Tiere,

## 5 - Diskussion

---

die hohe Mengen an Carotinoiden aufnehmen, wäre es möglich, bei ausreichender Kontrolle der Vitamin-A-Aufnahme den Gehalt in der Leber auf 6-15 mg/100g Rohleber zu halten (Landes 1994).

Die Analyse der Leberproben auf Isomere des Retinols nach Hydrolyse der Retinylester ergab, daß 85-90 % des Retinols in Rohleber in der *all-trans*-Form vorlag, der restliche Anteil verteilte sich auf die *cis*-Isomere, wobei das 13-*cis*-Isomer mit 8-10 % die Hauptform darstellte. Nach dem Bratprozeß wurde ein geringer Anteil (ca. 6 %) des *all-trans*-Isomers in die 13-*cis*-Form überführt. Eine Zunahme der Isomerisierung der *all-trans*-Form von Retinol und Retinylestern durch den Garungsprozeß ist auch von Brinkmann et al. (1994) beschrieben. Die Isomerisierung stellt ebenso wie die Zerstörung von Vitamin A durch den Bratprozeß eine Verringerung der Vitamin-A-Aktivität der Mahlzeit dar, weil *cis*-Isomere des Retinols eine geringere biologische Aktivität aufweisen als die *all-trans*-Form (Weiser and Somorjai 1992).

### 5.1.2 Bedeutung der neu identifizierten Plasma-Metaboliten

#### 5.1.2.1 9-*cis*-RA

9-*cis*-RA wurde erstmals als Metabolit in menschlichem Plasma nach Verzehr einer Lebermahlzeit identifiziert. In früheren Studien zum Metabolismus von Vitamin A nach Supplementation trat jedoch ebenfalls ein Peak auf, der mit authentischer 9-*cis*-RA koeluierte. Die Identität dieses Peaks konnte zu dieser Zeit jedoch noch nicht verifiziert werden (Eckhoff et al. 1991), da keine Standardsubstanz verfügbar war. Es ist daher anzunehmen, daß 9-*cis*-RA auch nach Vitamin-A-Supplementation gebildet wird.

9-*cis*-RA wurde als endogen vorkommender Ligand und Aktivator des RXR beschrieben (Levin et al. 1992; Heyman et al. 1992). Das endogene Vorkommen von 9-*cis*-RA konnte in Nieren und Lebern von Mäusen (Heyman et al. 1992), in den Nebenhoden der Ratte (Pappas et al. 1993), in embryonalem, menschlichen Gehirn (Kraft et al. 1993), in *Xenopus*-Embryonen (Kraft and Juchau 1995) und in Plasma neugeborener Kälber und deren Muttertieren in der Perinatalperiode (Horst et al. 1995; Horst et al. 1995) nachgewiesen werden.

*In vitro*-Versuche und tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, daß 9-*cis*-RA die Proliferation von Zellen hemmt, aber die Differenzierung fördert. Diese Fähigkeit ließ die Substanz als



## 5 - Diskussion

---

Therapeutikum für bestimmte Krebsformen interessant erscheinen. Als *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung antiproliferierender bzw. differenzierender Wirkungen von 9-*cis*-RA wurden überwiegend HL-60-Zellen verwendet, d.h. eine permanente Zelllinie, die ursprünglich von einem Patienten mit akuter promyelocytischer Leukämie (APL) stammte. Die Potenz von 9-*cis*-RA zur Differenzierung von HL-60-Zellen war mit der von all-*trans*-RA vergleichbar (Sakashita et al. 1993; Kizaki et al. 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, daß 9-*cis*-RA das Wachstum frischer Leukämiezellen von APL-Patienten hemmen konnte (Sakashita et al. 1993). Im Zusammenspiel mit Interferon  $\gamma$  hemmte 9-*cis*-RA das Wachstum von Brustkrebszellen potenter als all-*trans*-RA (Marth et al. 1993). Durch Behandlung mit 9-*cis*-RA konnte außerdem die HIV-I-Bildung durch T-Zellen, die mit Phorbolmyristat stimuliert wurden, gehemmt werden (Yamaguchi et al. 1994). Erste klinische Studien mit 9-*cis*-RA zur Behandlung von APL zeigten, daß eine Remission der Symptome erreicht werden kann, aber eine durch vorangegangene all-*trans*-RA-Behandlung erwirkte Retinoid-Resistenz nicht überwunden wird (Miller-WH et al. 1995).

Angaben über eine teratogene Potenz dieser Substanz sind sehr widersprüchlich. Da 9-*cis*-RA sowohl ein RAR- als auch ein RXR-Ligand sein kann, ist auch die Expression dieser Rezeptoren in verschiedenen biologischen Systemen und zu verschiedenen Entwicklungsstadien für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich. 9-*cis*-RA zeigte sich weniger potent als all-*trans*-RA bezüglich der teratogenen Wirkung in Mäusen (Kochhar et al. 1995), war aber 25-fach aktiver bei der Induktion von Duplikationen der Finger in der Gewebeknospe von Hühnerflügeln (Thaller et al. 1993). Auch in *Xenopus*-Embryonen war 9-*cis*-RA ein stärkeres Dysmorphogen als all-*trans*-RA (Kraft et al. 1994). Die Behandlung trächtiger Ratten mit 9-*cis*-RA zeigte, daß dieser Metabolit im Vergleich zu all-*trans*-RA nur in geringem Maße zum Embryo übergeht (Tzimas et al. 1994). 9-*cis*-RA erreichte 2 h nach oraler Gabe einer Dosis von 100 mg/kg KG im Embryo nur 17 % der Konzentration im maternalen Plasma, während in anderen Geweben (Milz, Lunge, Niere, Leber) ähnliche hohe oder sogar höhere Werte als im Plasma gemessen wurden (Sass 1996).

Neben der Beeinflussung von Signalwegen, die über die Bildung von RAR-RXR-Heterodimeren vermittelt werden, scheint 9-*cis*-RA auch Einfluß auf die Wirkung anderer RXR-Heterodimer-Partner zu haben. So konnte gezeigt werden, daß 9-*cis*-RA den stimulatorischen Effekt von 1,25-

## 5 - Diskussion

---

dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> auf die Chondrogenese von Mesenchymzellen des Hühnerflügels antagonisiert, obwohl die alleinige Gabe von 9-*cis*-RA ebenfalls stimulierend wirkte (Tsonis et al. 1996). In diesem System konnten sowohl der RXR als auch der Vitamin-D-Rezeptor nachgewiesen werden, so daß die Effekte vermutlich über Rezeptoren vermittelt wurden. 9-*cis*-RA wirkte ebenso induzierend auf die Expression des hepatischen FABP, die über RXR-Heterodimere mit dem Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptor (PPAR) stimuliert wurde (Poirier et al. 1997).

Die Entstehung von 9-*cis*-RA nach dem Verzehr einer Lebermahlzeit kann auf mehreren Wegen erfolgen:

- a) Isomerisierung von all-*trans*-RA zu 9-*cis*-RA (Levin et al. 1992; Urbach and Rando 1994)
- b) Isomerisierung von all-*trans*-Retinol zu 9-*cis*-Retinol und anschließende Oxidation (bisher nicht belegt).
- c) Oxidation von 9-*cis*-Retinol zur entsprechenden Retinsäure. 9-*cis*-Retinol konnte in Rattennieren als endogenes Retinoid identifiziert werden (Labrecque et al. 1995) und trat in Form der Ester auch in Lebern von Schlachttieren auf (Brinkmann et al. 1995).
- d) Enzymatische Spaltung von in Leber vorkommendem 9-*cis*-β-Carotin und anschließende Oxidation von 9-*cis*-Retinal (Wang et al. 1994; Hebutterne et al. 1995).

Da 9-*cis*-RA in Konzentrationen von 4-9 ng/g endogen in Lebern und Nieren von Mäusen nachgewiesen wurde (Heyman et al. 1992), ist außerdem nicht auszuschließen, daß die Lebermahlzeit bereits vorgeformte 9-*cis*-RA enthielt. Ob solch geringe Konzentrationen an 9-*cis*-RA, wie sie im Vergleich zu anderen Metaboliten nach Verzehr einer Lebermahlzeit im Plasma auftraten, *in vivo* Wirkungen ausüben können, ist nicht hinreichend geklärt. In der Ratte wurden Plasmakonzentrationen von ca. 15 ng/ml mit einer Induktion der Genexpression von CRBP II in Verbindung gebracht (Kojima et al. 1994). Es ist bekannt, daß die Expression des Gens über RXR-Homodimere reguliert werden kann. In einem *in vitro*-Transaktivierungs-Assay für den RXRα konnte eine EC<sub>50</sub>-Konzentration von 2,5 nM 9-*cis*-RA ermittelt werden (LeMotte et al. 1996). Dieser Wert entspricht einer Konzentration von 0,75 ng/ml. Während endogene 9-*cis*-RA-Spiegel unterhalb der Bestimmungsgrenze (< 0,3 ng/ml) lagen, traten nach Leberverzehr

## 5 - Diskussion

---

Plasmaspiegel auf ( $C_{\max}$   $2,7 \pm 1,1$  ng/ml), die deutlich über den für die *in vitro*-Transaktivierung von RXR $\alpha$  nötigen Konzentrationen lagen.

### 5.1.2.2 9,13-di-*cis*-RA

9,13-di-*cis*-RA konnte in Humanplasma in beträchtlichen Konzentrationen ( $C_{\max}$   $17,1 \pm 5,8$  ng/ml) nachgewiesen werden. Ein Vergleich der  $\Delta$ AUC-Werte der RA-Isomere ergab, daß 9,13-di-*cis*-RA nach 13-*cis*-RA das Hauptisomer in Humanplasma war und mit 26,4 % an der Gesamtmenge der RA-Isomere im Plasma beitrug. Die Plasmakinetik wies einen der Kinetik von 9-*cis*-RA entsprechenden Verlauf auf. Obwohl auch geringe Mengen 9,13-di-*cis*-Retinol in der verabreichten Putenleber detektiert werden konnten (ca. 1 % des gesamten Vitamin A), ist anzunehmen, daß der Hauptteil an 9,13-di-*cis*-RA aus 9-*cis*-RA entstand. Die Bildung von 9,13-di-*cis*-RA aus 13-*cis*-RA wäre theoretisch auch möglich, dagegen spricht jedoch, daß die Plasmakinetik von 13-*cis*-RA einen anderen Verlauf aufweist. Da 13-*cis*-RA auch noch nach 24 h im Plasma erhöht war, wäre nicht zu erklären, warum 9,13-di-*cis*-RA schon nach 10-12 h nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

9,13-di-*cis*-RA konnte in Plasma von Ratten sowohl nach Gabe von 9-*cis*-Retinaldehyd als auch von 9-*cis*-RA nachgewiesen werden (Sass 1996). Daher ist anzunehmen, daß die Isomerisierung auf der Ebene des Retinaldehyds oder der Retinsäure stattfinden kann. Nach Gabe von 9-*cis*-RA an trächtige Ratten zeigte 9,13-di-*cis*-RA einen geringen Transfer vom Plasma in andere Gewebe, einschließlich dem Embryo (Tzimas et al. 1994). Die Verabreichung teratogener Dosen Retinylpalmitat an Kaninchen führte zur Bildung von 9,13-di-*cis*-RA, die die Hauptform der RA-Isomere im Plasma darstellte, im Vergleich zu all-*trans*-RA aber einen sehr geringen plazentaren Transfer aufwies (Tzimas et al. 1996). In neugeborenen Kälbern, die nur mit Kolostrum ernährt wurden, konnte 9,13-di-*cis*-RA als endogene Retinsäure mit Plasmaspiegeln von 5-6 ng/ml ca. 48 h nach der Geburt nachgewiesen werden, wohingegen die anderen Isomere nur in Spuren vorkamen (Horst et al. 1995). Diese Entdeckung führte zu einem verstärkten Interesse an dem Metaboliten, da man vermutete, daß 9,13-di-*cis*-RA aufgrund des endogenen Vorkommens im Plasma neugeborener Kälber einen Einfluß auf Immunparameter haben könnte. In einer *in vitro*-Studie wurde der Einfluß von physiologischen Konzentrationen 9,13-di-*cis*-RA ( $10^{-8}$  M) auf die Reaktivität und den Phenotyp von mononukleären Leukozyten aus dem Blut junger Kühe

## 5 - Diskussion

---

untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluß auf die Sekretion von Signalmolekülen oder auf den Phenotyp der Zellen festgestellt werden (Nonnecke et al. 1997). Auf der anderen Seite wurde in humanen Kupfer-Sternzellen (LI90) die Produktion von Wachstumsfaktoren durch Gabe von 9,13-di-*cis*-RA ( $10^{-6}$  M) stimuliert (Imai et al. 1997). Durch Vergleich der Wirkung von 9,13-di-*cis*-RA mit der Wirkung selektiver RAR-Liganden wurde geschlossen, daß der Effekt vermutlich über RAR $\alpha$  vermittelt wurde. In dieser Studie hatte man allerdings versäumt, die Zellkulturen auf Metaboliten von 9,13-di-*cis*-RA zu untersuchen, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Wirkung durch Isomerisierung zu anderen RA-Isomeren (z.B. zu 9-*cis*-RA) hervorgerufen wurde.

Über die mögliche teratogene Aktivität von 9,13-di-*cis*-RA ist bisher wenig bekannt. Dymorphogene Effekte in *Xenopus*-Embryonen nach Gabe dieser Substanz waren vermutlich auf die Isomerisierung zu 9-*cis*-RA zurückzuführen (Kraft and Juchau 1995).

### 5.1.2.3 14-HRR

14-HRR wurde neben 9-*cis*- und 9,13-di-*cis*-RA als weiterer neuer Metabolit in Humanplasma nach Leberverzehr identifiziert. Im Plasma wurden  $C_{\max}$ -Werte von  $3,7 \pm 0,9$  ng/ml erreicht. 14-HRR trat auch 24 h nach Leberverzehr noch in meßbaren Konzentrationen auf ( $C_{24h}$   $2,4 \pm 0,6$  ng/ml).

14-HRR konnte *in vivo* nach Gabe von Vitamin A in Plasma und Geweben von Mäusen, Ratten und Kaninchen identifiziert werden (Tzimas et al. 1996). Nach topischer Applikation von Retinol wurde 14-HRR in der Haut von Mäusen und Menschen nachgewiesen (Sass et al. 1996; Duell et al. 1996). Die Synthese von 14-HRR aus Retinol gelang auch *in vitro* in verschiedenen Zellsystemen (Buck et al. 1991; Ross and Hämmerling 1994), über die an dieser metabolischen Aktivierung beteiligten Enzyme herrscht bisher jedoch Unklarheit. Das Interesse an diesem *retro*-Retinoid nahm zu, nachdem entdeckt wurde, daß 14-HRR das Wachstum von B- und T-Lymphozyten *in vitro* bei 10- bis 100-fach geringeren Konzentrationen stimulieren konnte als Retinol, wohingegen all-*trans*-RA in diesen Systemen nahezu inaktiv war (Buck et al. 1991; Garbe et al. 1992).

Untersuchungen zur Kinetik von 14-HRR nach Gabe von Retinol (50 mg/kg KG) an trächtige Mäuse ergaben, daß dieser Metabolit trotz niedriger Plasmaspiegel in Leber, Niere, Plazenta und

Embryo sehr hohe Konzentrationen erreichte und auch sehr lange in den Geweben persistierte (Tzimas et al. 1996). Die teratogene Wirkung von 14-HRR in Mäusen war jedoch im Vergleich zu Retinol wesentlich geringer. Nach Verabreichung von 14-HRR in einer Dosis von 60 mg/kg KG an GD 7,5 (sensitives Zeitfenster für kraniofaziale Defekte) traten 14% Resorptionen und 8 % Augenmißbildungen auf. Bei der gleichen Dosis Retinol waren sowohl Resorptionen (44 %) als auch Augenmißbildungen (66 %) höher, außerdem wiesen 10 % der Nachkommenschaft Exenzephalie auf (Mao et al. 1996). Da nicht alle teratogenen Wirkungen von Vitamin A über die Bioaktivierung zu all-*trans*-RA erklärt werden konnten (Collins et al. 1992; Collins et al. 1994), könnte die andauernde, embryonale Exposition mit 14-HRR nach Gabe hoher Vitamin-A-Mengen zu einer teratogenen Wirkung von Vitamin A additiv beitragen.

### **5.1.3 Bedeutung anderer Plasma-Metaboliten von Vitamin A**

#### **5.1.3.1 Retinol und RBP**

Plasmaspiegel von Retinol werden homöostatisch reguliert, so daß sie relativ unabhängig von der aktuellen Vitamin-A-Zufuhr sind. Nach Verabreichung der Lebermahlzeit fand jedoch ein merklicher Anstieg der Plasmaspiegel statt. Über den Zeitraum von 4 h bis 10 h nach Leberverzehr waren die Retinol-Konzentrationen signifikant über endogene Werte erhöht ( $P < 0,001$ ; Student's t-test). In anderen Studien zum Metabolismus von Vitamin A beim Menschen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Eckhoff et al. 1991; Buss et al. 1994). Das Ausmaß der zusätzlichen Retinol-Exposition spiegelte sich auch im  $\Delta$ AUC-Wert wieder ( $1436 \pm 1543 \text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ ), der allerdings sehr große interindividuelle Schwankungen aufwies. Da Retinol im Plasma in einem 1:1-Verhältnis an das spezifische Trägerprotein RBP gebunden wird, wurden auch die RBP-Spiegel im Plasma gemessen und das molare Verhältnis Retinol/RBP berechnet. Vor Verabreichung der Lebermahlzeit lag noch ein geringer RBP-Überschuß vor, die RBP-Konzentrationen stiegen im Plasma nach Leberverzehr jedoch nicht an, was zu einem molaren Überschuß von Retinol im Plasma führte. Das molare Verhältnis Retinol/RBP war nach 10 h und 24 h signifikant größer als 1,0 ( $P < 0,01$ ; Student's t-test). Zu diesen Zeitpunkten waren die RBP-Spiegel allerdings deutlich niedriger als zu den anderen Zeitpunkten. Dennoch war festzustellen, daß die Retinolspiegel nach Verzehr einer Lebermahlzeit

## 5 - Diskussion

---

trotz der homöostatischen Kontrolle stiegen, während RBP-Spiegel konstant blieben oder sogar sanken.

Da aus der Leber nur an RBP gebundenes Retinol an die Blutzirkulation abgegeben wird, kann davon ausgegangen werden, daß die erhöhte Retinol-Exposition im Plasma nicht durch eine hepatische Freisetzung von Retinol zustande gekommen ist. Es liegt vielmehr die Vermutung nahe, daß ein Teil des absorbierten Retinols im Intestinaltrakt nicht wieder verestert wurde, sondern als unverestertes Retinol entweder über die Portalvene oder in Chylomikronen verpackt über die Lymphe in die systemische Zirkulation gelangte. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte, daß 5-20 % einer oral verabreichten Vitamin-A-Dosis in Form von unverestertem Retinol in Low-Density Lipoprotein-Fraktionen (LDL) aus dem Dünndarm abgegeben werden können (Le et al. 1997).

Inwieweit freies Retinol zum Embryo übergehen kann, ist nicht hinreichend geklärt. *In vitro*-Studien haben gezeigt, daß Retinol aus dem RBP-Komplex in den Dottersack kultivierter Maus- oder Ratten-Embryonen übergeht und dort von einem *in situ* produzierten Dottersack-RBP übernommen wird (Ward et al. 1997; Bavik et al. 1996). Inhibierung der Synthese dieses Dottersack-Proteins führte zu einer Blockierung des Retinol-Transfers und damit zu Mißbildungen aufgrund von Vitamin-A-Defizienz. Allerdings konnte in einer anderen Studie an Affen bewiesen werden, daß ein Teil einer verabreichten Retinol-Dosis in embryonalem Plasma in Lipoprotein-Fraktionen und nicht gebunden an RBP vorlag (Vahlquist and Nilsson 1984). Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß Retinol die embryonale Zirkulation auch über andere Wege als durch die Übertragung mittels RBP erreicht. In diesem Zusammenhang könnte eine kürzlich erschienene Arbeit eine Erklärung bieten. In humanen, embryonalen Membranen (Epithelgewebe der Amnionhöhle und Trophoblasten), die nach der Entbindung untersucht wurden, konnten Lipoprotein-Lipasen und LDL-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Autoren schlossen daraus, daß Lipoproteine aus der Amnionflüssigkeit oder der maternalen Zirkulation den menschlichen Embryo erreichen können (Huter et al. 1997).

Nach Gabe einer teratogenen Dosis Retinol (100 mg Retinol/kg KG) an trächtige Mäuse (GD 11) konnte sowohl im Plasma als auch in embryonalen Geweben ein starker Anstieg der Retinolspiegel festgestellt werden (Eckhoff et al. 1989). Retinylester akkumulierten hingegen langsamer im Embryo, da sie vermutlich nicht durch plazentaren Transfer, sondern durch eine im

## 5 - Diskussion

---

Embryo stattfindende Veresterung von Retinol dorthin gelangten und akkumulierten (Eckhoff et al. 1989). Die Akkumulierung führte zu der Aufrechterhaltung hoher Retinol-Konzentrationen im Embryo (Eckhoff et al. 1989). In dem Experiment trat im Vergleich zur Gabe einer teratogenen Dosis des sehr potenten Teratogens *all-trans*-RA (10 mg/kg KG) eine merklich höhere Anzahl an Skelettanomalien (Extremitäten und Gaumen) auf (Eckhoff et al. 1989), obwohl der embryonale AUC für *all-trans*-RA nach Retinol-Gabe (1000 ng·h/g) nur 12 % des embryonalen AUC nach Verabreichung von *all-trans*-RA (8200 ng·h/g) entsprach (Creech et al. 1989; Eckhoff et al. 1989). Eckhoff et al. schlossen daraus, daß Retinol selbst einen intrinsischen teratogenen Effekt ausüben muß. Zu diesem Schluß kamen auch andere Autoren (Kochhar et al. 1988).

Im Gegensatz zur einmaligen Gabe einer hohen Retinol-Dosis führte die Verabreichung täglicher, geringer Dosen von Retinol (10 mg/kg KG) über einen Zeitraum von 10 Tagen (GD 2 bis GD 11) an trächtige Mäuse zu keinem signifikanten, teratogenen Effekt. Nach Applikation der letzten Dosis wurden über einen Zeitraum von 24 h Plasma- und Embryospiegel der Retinoide gemessen. Es konnten nur sehr geringe Mengen *all-trans*-RA im Embryo detektiert werden. Weiterhin fand keine nennenswerte Akkumulation von Retinol statt.

Durch *in vivo*-Hemmung des oxidativen Metabolismus einer teratogenen Dosis Retinol (50 mg/kg KG) zu *all-trans*-RA in trächtigen Mäusen mittels Vorbehandlung mit 4-Methylpyrazol (ADH-Hemmer) konnte der embryonale AUC von *all-trans*-RA im Vergleich zur nicht vorbehandelten Gruppe um 84 % reduziert werden. Dadurch gingen die Mißbildungsraten zwar zurück, konnten aber nicht vollständig aufgehoben werden (Collins et al. 1992). Diese Studie hat gezeigt, daß die teratogenen Effekte in der Maus nach Gabe hoher Retinol-Dosen nicht ausschließlich auf den maternalen Metabolismus von Retinol zur aktiven *all-trans*-RA zurückzuführen ist, sondern auch das Resultat hoher Retinol-Konzentrationen im Embryo sein könnte.

Ob Retinol einen direkten oder indirekten (synergistischen) Effekt ausübt, ist nicht geklärt. Ein synergistischer Effekt wäre in Bezug auf die Verfügbarkeit von *all-trans*-RA in intrazellulären Kompartimenten (Cytoplasma oder Nukleus) möglich. Es ist beschrieben, daß Retinol die Fluidität von Membranen verringern kann (Meeks et al. 1981) bzw. membrandestabilisierend wirkt (Bangham et al. 1964), so daß Fremdsubstanzen die Durchdringung der Membranen erleichtert wird.

## 5 - Diskussion

---

Aus diesen in der Literatur beschriebenen Effekten von Retinol kann geschlossen werden, daß überhöhte Retinolspiegel, wie sie nach dem Verzehr einer Lebermahlzeit in Humanplasma auftraten, einen Beitrag zu einem möglichen, teratogenen Risiko leisten könnte. Der molare Überschuß von Retinol gegenüber RBP im Plasma ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß der Organismus Vitamin-A-Mengen ausgesetzt wird, die er mit den vorhandenen, biologisch wichtigen Mechanismen der Prozessierung (Veresterung, Transport in Chylomikronen) nicht mehr verarbeiten kann.

### 5.1.3.2 Retinylester

Retinylpalmitat/-oleat trugen gemessen am  $\Delta$ AUC-Wert mit 65 % zur Gesamtexposition an Retinylestern bei, gefolgt von Retinylstearat (29 %) und -linoleat (6 %). Diese Zusammensetzung der Retinylester im Plasma entsprach ungefähr der Zusammensetzung in der verabreichten Putenleber. Die Kinetik der Retinylester ist mit der hepatischen Clearance von Chylomikronen aus dem Plasma erklärbar. Dies zeigte eine andere Studie, in der bis 12 h nach Gabe einer Testmahlzeit ca. 97 % der Retinylester in Chylomikronen und nur 3 % in LDL-Fraktionen wiedergefunden wurden (Berr and Kern 1984). Die Aufnahme von Chylomikronen in andere Gewebe als die Leber wurde bei Kaninchen und Primaten festgestellt (Hussain et al. 1989; Hussain et al. 1989). Etwa ein Drittel bis die Hälfte der Lipide aus Chylomikronen können vom Knochenmark aufgenommen werden. Knochenmark von Kaninchen enthält sehr hohe Mengen all-*trans*-RA (Blaner et al. 1991), die für die normale Differenzierung von Leukozyten essentiell zu sein scheint (Warrell-RP et al. 1991). Bisher ist jedoch nichts darüber bekannt, ob Chylomikronen die plazentare Barriere überwinden können. Da ein gewisser Anteil der Retinylester aber auch in LDL-Fraktionen vorhanden ist, deren Aufnahme in den Embryo über die Plazenta durchaus möglich erscheint (s. 5.1.3.1), kann auch eine hohe systemische Retinylester-Exposition zu einer Akkumulation von Retinoiden im Embryo beitragen.



## 5 - Diskussion

---

### 5.1.3.3 All-trans-RA

Die endogenen Plasmaspiegel an all-*trans*-RA, die in dieser Studie nur zu einem Zeitpunkt gemessen wurden, stiegen nach der Lebermahlzeit innerhalb von 2-4 h auf das 2,5-fache an und sanken anschließend signifikant auf Werte unterhalb der endogenen Konzentrationen. Nach 24 h waren wieder endogene Werte erreicht. Aufgrund des Sinkens der Werte unterhalb endogener Spiegel traten in einigen Fällen negative  $\Delta$ AUC-Werte auf. Dieses Phänomen trat auch in der Studie von Chen et al. (1996) nach chronischer Vitamin-A-Supplementation auf, eine Erklärung wurde dafür nicht angegeben. Es ist jedoch bekannt, daß all-*trans*-RA-Spiegel beim Menschen tageszeitlichen Schwankungen unterliegen (Buchan et al. 1994), so daß das Absinken der Plasmaspiegel das Resultat schwankender, endogener Konzentrationen sein könnte. Weiterhin wäre möglich, daß die Erhöhung der Plasmaspiegel an all-*trans*-RA über spezifische und physiologisch responsive, zelluläre Prozesse zu einer gesteigerten Aufnahme dieses Metaboliten in periphere Gewebe geführt haben könnte (Kurlandsky et al. 1995).

All-*trans*-RA ist der wichtigste Ligand für den RAR. Es ist gegenwärtig nicht bekannt, ob und wieviel all-*trans*-RA den Embryo über den maternalen Kreislauf erreicht bzw. welche Mengen all-*trans*-RA vom Embryo selbst aus Retinol erzeugt werden. Beide Möglichkeiten tragen vermutlich zu embryonalen all-*trans*-RA-Spiegeln bei. Studien zum plazentaren Transfer radioaktiv markierter all-*trans*-RA haben gezeigt, daß eine sehr spezifische Verteilung von all-*trans*-RA innerhalb embryonaler Strukturen stattfindet. Diese Verteilung ließ auf einen direkten plazentaren Transfer von all-*trans*-RA schließen, an dem CRABP I und II entscheidend beteiligt sind (Sapin et al. 1997). All-*trans*-RA erwies sich in allen bisher untersuchten Spezies als teratogen. Die Inter-Spezies-Variation bezüglich der geringsten teratogenen Dosen sind jedoch nicht so groß wie z.B. bei Retinol oder 13-*cis*-RA. Sie schwanken zwischen 2 mg/kg KG bei Ratten und Kaninchen und 12,5 mg/kg KG bei Hamstern (Nau 1992). In zwei Kaninchen-Studien wurde die embryonale Exposition mit Retinoiden nach Gabe einer teratogenen Dosis Retinylpalmitat bzw. all-*trans*-RA verglichen (Tzimas et al. 1996). In beiden Studien waren die embryonalen AUC-Werte für all-*trans*-RA nahezu identisch, so daß all-*trans*-RA als das im Kaninchen verantwortliche Teratogen nach Vitamin-A-Gabe angesehen wurde. Das Ausmaß der embryonalen Exposition mit all-*trans*-RA stand im deutlichen Gegensatz zu den geringen Plasmakonzentrationen dieses Retinoids, die nur 1,2- bis 2,3-fach über physiologische

## 5 - Diskussion

---

Konzentrationen erhöht waren. Dieser Vergleich legt die Vermutung nahe, daß die geringen Plasmakonzentrationen von all-*trans*-RA nach Leberverzehr durchaus mit einer Akkumulation dieses Metaboliten im Embryo einhergehen könnte.

### 5.1.3.4 13-*cis*-RA

Endogene Konzentrationen an 13-*cis*-RA stimmten mit denen früherer Studien gut überein (Eckhoff and Nau 1990; Buss et al. 1994). Nach Leberverzehr stiegen die Spiegel signifikant an. Die Elimination erfolgte wesentlich langsamer als die der anderen RA-Isomere. Gemessen am  $\Delta$ AUC-Wert trug 13-*cis*-RA mit 67% an der gesamten RA-Exposition im Plasma bei und stellte damit das quantitativ bedeutendste Isomer dar.

13-*cis*-RA (Isotretinoin), die seit 1982 als synthetisches Retinoid zur Behandlung von schwerer Akne eingesetzt wird, zählt zu den bestätigten, menschlichen Teratogenen (Lammer et al. 1985). 13-*cis*-RA erwies sich auch in vielen Tierspezies als teratogen, z.B. in Makaken (Hummler et al. 1990; Kraft et al. 1991; Hummler et al. 1994), Kaninchen (Eckhoff et al. 1994), Hamstern (Willhite and Shealy 1984), Ratten (Collins et al. 1994; Tzimas et al. 1995) und Mäusen (Kraft et al. 1991; Tzimas et al. 1995). Die Retinoid-Embryopathie ist im Hinblick auf die Übereinstimmungen der Mißbildungen in verschiedenen Spezies bemerkenswert, obwohl die verabreichten Dosen zwischen 1 mg/kg/Tag beim Menschen (beruhend auf epidemiologischen Daten nach Isotretinoin-Therapie) und 100 mg/kg/Tag bei Ratten und Mäusen lagen (Tzimas et al. 1995).

Frühere Studien zur Teratogenität von 13-*cis*-RA haben ergeben, daß 13-*cis*-RA bei Nagern ein wesentlich schwächeres Teratogen ist als all-*trans*-RA. Die geringste, teratogene Dosis war bei Hamstern ca. 4-fach (Willhite et al. 1989) und bei Mäusen 25-fach höher als die entsprechenden Dosen all-*trans*-RA. Die Bestimmung von Pharmakokinetiken in maternalem Plasma und in Embryonen von Mäusen zeigten, daß die geringere teratogene Potenz von 13-*cis*-RA mit einer schnellen Elimination, einer extensiven Glukuronidierung (gleichbedeutend mit einer Detoxifizierung) und einem begrenzten plazentaren Transfer begründet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei Studien an Makaken ein wesentlich höherer Transfer von 13-*cis*-RA zum Embryo festgestellt als in anderen Spezies (Hummler et al. 1994). Ein Vergleich der Pharmakokinetiken und der embryonalen Exposition nach einer teratogenen Dosis 13-*cis*-RA

## 5 - Diskussion

---

bzw. einer nicht-teratogenen Dosis all-*trans*-RA in dieser Spezies zeigte, daß die Konvertierung von 13-*cis*-RA zu all-*trans*-RA nicht ausschließlich für die teratogene Wirkung von 13-*cis*-RA verantwortlich sein konnte (Tzimas et al. 1996). Auch im Kaninchen wurde 13-*cis*-RA eine intrinsische, teratogene Aktivität zugeschrieben (Tzimas et al. 1994). Die Bindungsaffinität von 13-*cis*-RA an Retinoid-Rezeptoren ist im Vergleich zu all-*trans*-RA jedoch vernachlässigbar. Neue Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von all-*trans*-RA und 13-*cis*-RA in embryonalem Gewebe könnten Hinweise darauf geben, daß 13-*cis*-RA als Transportform für all-*trans*-RA vom Cytosol in den Nukleus dienen und dort zu all-*trans*-RA konvertiert werden könnte (Rühl et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Trächtigen Mäusen wurden an GD 11 teratogene Dosen 13-*cis*-RA (100 mg/kg KG) oder all-*trans*-RA (10 mg/kg KG) verabreicht. 1 h und 4 h nach Behandlung wurde die subzelluläre Lokalisation der RA-Isomere in embryonalem Gewebe untersucht. Nach Behandlung mit 13-*cis*-RA wurde diese Substanz hauptsächlich in Nukleus-Fractionen (81-97%) und nur bis zu 15 % in cytosolischen Fractionen detektiert. Im Gegensatz dazu konnte nach Applikation von all-*trans*-RA der Großteil dieses Metaboliten in cytosolischen Fractionen (63-79 %) und nur geringfügige Mengen (20-33 %) in nukleären Fractionen wiedergefunden werden. Diese Daten zeigen, daß 13-*cis*-RA den Nukleus in größerem Umfang erreicht als all-*trans*-RA. Ein Grund dafür könnte sein, daß all-*trans*-RA im Cytosol an CRABP gebunden wird und damit der Transfer zum Nukleus begrenzt wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen die nach Leberverzehr gemessenen Plasmaspiegel an 13-*cis*-RA einen zusätzlichen Faktor für ein potentielles, teratogenes Risiko darzustellen.

### 5.1.3.5 13-*cis*-4-oxo-RA

Das endogene Vorkommen von 13-*cis*-4-oxo-RA in Humanplasma in Konzentrationen, die über denen der RA-Isomere lagen, ist auch in anderen Studien beschrieben (Eckhoff und Nau 1990; Buss et al. 1994). Nach Leberverzehr stellte 13-*cis*-4-oxo-RA mit einem  $\Delta AUC$ -Wert von  $379,2 \pm 63,0$  ng\*h/ml den Hauptmetaboliten des oxidativen Phase-I-Metabolismus dar. Die späte  $T_{max}$  ( $10,6 \pm 1,3$  h) deutete daraufhin, daß dieser Metabolit aus 13-*cis*-RA gebildet wurde. Auch nach Vitamin-A-Supplementation bzw. nach Isotretinoin-Therapie war 13-*cis*-4-oxo-RA das Hauptprodukt des oxidativen Stoffwechsels (Brazell et al. 1983; Buss et al. 1994). Es existieren sehr große Speziesunterschiede bezüglich des Metabolismus von 13-*cis*-RA. Bei Nagern

## 5 - Diskussion

---

(Mäusen, Ratten) fand überwiegend eine Glukuronidierung zu 13-*cis*-RAG statt (Collins et al. 1994), beim Kaninchen und Affen überwog hingegen die Bildung von 13-*cis*-4-oxo-RA (Hummler et al. 1994; Tzimas et al. 1996). Glukuronide wiesen in Mäusen (Creech et al. 1989), Ratten (Collins et al. 1994) oder Kaninchen (Tzimas et al. 1996) nur einen geringen, plazentaren Transfer auf. Beim Menschen sind Glukuronide zumindestens im Plasma nicht detektiert worden, so daß die Bildung von 13-*cis*-4-oxo-RA neben der Isomerisierung die einzige Möglichkeit zu sein scheint, 13-*cis*-RA-Spiegel abzubauen. Diese Tatsache könnte auch ein Grund dafür sein, warum 13-*cis*-4-oxo-RA endogen in so hohen Konzentrationen vorkommt und nach Vitamin-A-Gabe beim Menschen verstärkt gebildet wurde. Ob die Bildung dieser Verbindung eine Detoxifizierungsreaktion oder eine Aktivierung bedeutet, ist fraglich.

Nach Gabe teratogener Dosen 13-*cis*-RA an Makaken (Hummler et al. 1994) bzw. Kaninchen (Tzimas et al. 1994) stellte 13-*cis*-4-oxo-RA den Hauptmetaboliten von 13-*cis*-RA dar. Nur geringe Mengen 13-*cis*-RAG konnten detektiert werden. 13-*cis*-4-oxo-RA offenbarte in Makaken einen guten plazentaren Transfer (Embryo/Plasma-Ratio 0,33). Da diese Spezies zudem Retinoide nur in geringfügigem Umfang glukuronidierte, sind sie dem Menschen in Bezug auf den Metabolismus von 13-*cis*-RA sehr ähnlich. Aufgrund des ausgeprägten plazentaren Transfers von 13-*cis*-4-oxo-RA in dieser Spezies, kann auch beim Menschen nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Metabolit in den Embryo übergeht und dort eine schädigende Wirkung entfalten kann.

Direkte, embryotoxische Wirkungen von 13-*cis*-4-oxo-RA sind nur wenig untersucht. *In vitro*-Kulturen von Ratten-Embryonen wurden mit Mikroinjektionen von 13-*cis*-4-oxo-RA bzw. all-*trans*-RA behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß ca. 10-fach höhere Konzentrationen an 13-*cis*-4-oxo-RA nötig waren, um mit all-*trans*-RA vergleichbare, embryotoxische Effekte auszulösen (Kraft et al. 1992). *In vivo* führte die Gabe von 100 mg 13-*cis*-4-oxo-RA/kg KG an trächtige Mäuse zu Mißbildungen der Extremitäten-Anlagen und zu Gaumenspalten (Kochhar and Penner 1987). Interessanterweise konnten bei Gabe einer einzelnen Dosis der Muttersubstanz 13-*cis*-RA (ebenfalls 100 mg/kg KG) keine solchen Effekte beobachtet werden, sondern erst nach mehrfacher Gabe.

### 5.1.4 Metabolitenmuster in Humanplasma nach Supplementation bzw. Leberverzehr

Die Verabreichung von 15 bzw. 50 mg Vitamin A als Supplement oder 50 mg Vitamin A als Lebermahlzeit offenbarte in Bezug auf die Konzentrationen der Retinoide in Humanplasma deutliche Unterschiede. Da die Plasmaproben zu dem Zeitpunkt entnommen wurden, an dem die maximalen Konzentrationen der RA-Isomere im Plasma zu erwarten waren, wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen RA-Isomere am Gesamtpool der Retinsäuren im Plasma berechnet. Aus Abbildung 5.1 ist zu entnehmen, daß der Anteil an *all-trans*-RA nach Gabe von Leber nur 14,9 % betrug. Nach Gabe der gleichen Menge Vitamin A als Supplement stieg dieser Anteil auf nahezu 50 % der Gesamtmenge an RA-Isomeren an. Wurde die Supplementation auf 15 mg Vitamin A verringert, so reduzierte sich der Anteil an *all-trans*-RA auf 27,1 %. Interessant war außerdem, daß 9-*cis*-RA nach Verzehr von Leber mit einem beträchtlichen Anteil (6,8 %) zum Gesamtpool der RA-Isomere im Plasma beitrug, nach Gabe des 50 mg-Supplements aber nur einen geringen Anteil hatte (1,0 %) bzw. nach Gabe des 15 mg-Supplements gar nicht auftrat.

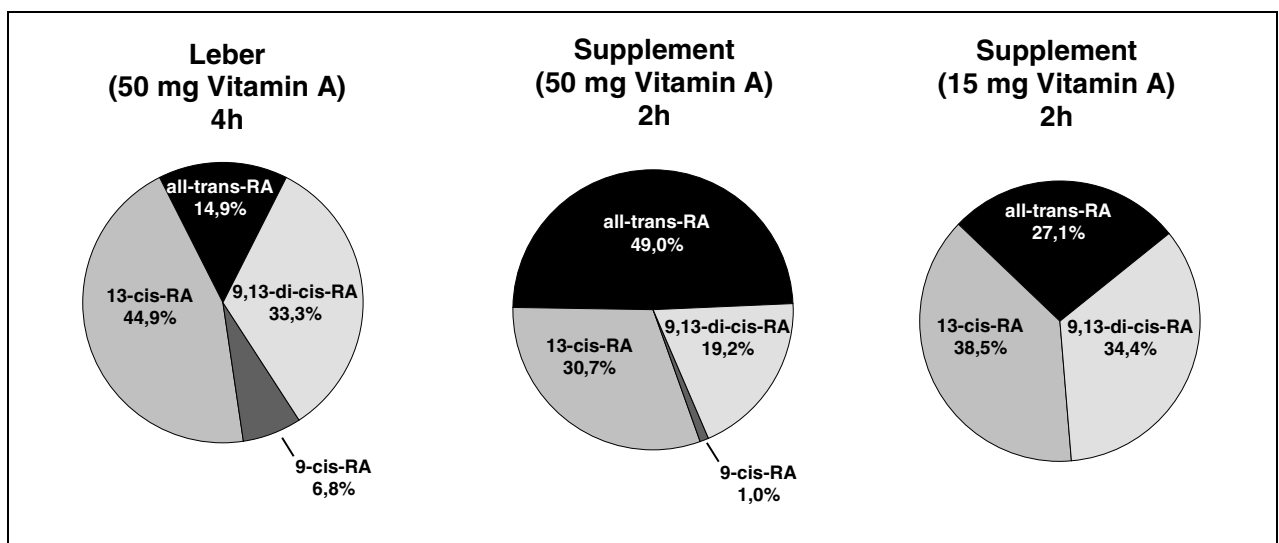


Abbildung 5.1: Prozentuale Anteile der RA-Isomere an der Gesamtmenge der Retinsäuren im Plasma 2 h nach Gabe von 15 mg bzw. 50 mg Vitamin A als Supplement oder 4 h nach Gabe von 50 mg Vitamin A als Lebermahlzeit.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß Leberproben *cis*-Isomere des Retinols enthalten, liegt die Vermutung nahe, daß ein Teil der im Plasma nach Leberverzehr detektierten *cis*-Isomere der Retinsäure durch direkte Oxidation der entsprechenden Retinol-Isomere

entstanden sind. Dies könnte erklären, warum der Anteil der *cis*-Isomere nach Leberverzehr im Vergleich zur Supplementation zugenommen hat. Anhand der Ergebnisse ist außerdem zu erkennen, daß die prozentuale Zusammensetzung der RA-Isomere in Plasma je nach Art der oralen Vitamin-A-Applikation sowie nach Höhe der verabreichten Vitamin-A-Dosis stark variierte. Dieses Phänomen wurde qualitativ bereits in Primaten beschrieben (Eckhoff et al. 1991), eine Erklärung wurde dafür jedoch nicht gefunden. Die Vermutung liegt jedoch nahe, daß die intestinale Prozessierung von Vitamin A (Veresterung, Transport, Speicherung) nach Gabe hoher Vitamin-A-Dosen als Supplement sättigbar ist, so daß ab einer gewissen Schwellendosis zusätzliche Metabolismuswege angeschaltet werden. Einer dieser Wege könnte die intestinale Oxidation von Retinol zu all-*trans*-RA darstellen (siehe Abschnitt 5.2).

### 5.2 Die Rolle des Intestinaltraktes nach Gabe hoher Vitamin-A-Dosen

#### 5.2.1 *In vitro*-Oxidation von Retinol zu all-*trans*-RA

*In vitro*-Studien mit freiem Retinol als Substrat haben gezeigt, daß lösliche Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) ebenso wie andere Dehydrogenasen die Synthese von all-*trans*-RA vollziehen können (Napoli and Race 1987; Napoli and Race 1990; Posch et al. 1989; Kim et al. 1992). Die Bildung von all-*trans*-RA aus ungebundenem Retinol wurde in Gegenwart cytosolischer und - in geringerem Maße - mikrosomaler Fraktionen verschiedener Gewebe beschrieben (Napoli and Race 1987; Siegenthaler 1990; Napoli and Race 1990; Posch et al. 1989; Napoli et al. 1991; Kim et al. 1992). In fast allen Geweben liegt Retinol jedoch nicht frei vor, sondern gebunden an CRBP I. Der Retinol-CRBP-Komplex scheint daher vorzugsweise das Substrat für die *in vivo*-Synthese von all-*trans*-RA darzustellen. Die Oxidation von an CRBP I gebundenem oder freiem Retinol wurde mit Cytosol aus Kalbsleber untersucht (Ottonello et al. 1993). Die  $K_M$ -Werte für CRBP-Retinol und freies Retinol betrugen 0,84  $\mu$ M bzw. 7,1  $\mu$ M. Der  $v_{max}$ -Wert für freies Retinol (15,8 pmol/min/mg Protein) war größer als der für gebundenes Retinol (10 pmol/min/mg Protein). Da die Dissoziationskonstante für den Retinol-CRBP-Komplex  $10^{-8}$  M beträgt und die  $K_M$ -Werte in der gleichen Größenordnung liegen, dürfte eine Dissoziation des Retinol-CRBP-Komplexes keine Voraussetzung für die Oxidation sein. Daraus wurde gefolgert, daß CRBP I durch Protein-Protein-Interaktionen mit den entsprechenden Enzymen Retinol zur gezielten Synthese von all-*trans*-RA kanalisiert (Napoli 1993). Diese

## 5 - Diskussion

---

Vermutung wurde dadurch unterstützt, daß sich Apo-CRBP I als spezifischer Inhibitor der all-*trans*-RA-Synthese erwies (Ottonello et al. 1993). Im Intestinaltrakt überwiegt das in seiner Funktion völlig anders ausgerichtete CRBP II, das an der Veresterung absorbierten Retinols beteiligt ist (Ong and Page 1987; Herr et al. 1993). CRBP I ist - wenn überhaupt - nur in sehr geringen Mengen vorhanden (Ong et al. 1991). Versuche an Ratten haben gezeigt, daß das molare Verhältnis unveresterten Retinols zu CRBP II nach Gabe exzessiver Dosen Vitamin A (als Retinylacetat) im Intestinaltrakt von <1 bei Kontrolltieren auf 3-19 bei behandelten Tieren ansteigen kann (Suzuki et al. 1995). Daraus folgt, daß bei Gabe hoher Vitamin-A-Dosen eine große Menge ungebundenen Retinols zur Verfügung steht, das dann durch nicht-spezifische Enzyme metabolisiert werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die *in vitro*-Oxidation von Retinol zu all-*trans*-RA in cytosolischen Fraktionen der Darmmukosa des Schweines nachgewiesen werden. In mikrosomalen Fraktionen wurde keine oxidative Aktivität festgestellt. Für die Reaktion wurde ein  $K_M$ -Wert von 96,4  $\mu\text{M}$  und ein  $v_{\max}$ -Wert von 8,6 pmol/min/mg Protein (für Retinol gelöst in Ethanol) berechnet. Ethanol lag in einem deutlichen Überschuß vor (1 Vol.-% Ethanol entspricht einer Konzentration von 174 mM). Die Inkubation cytosolischer Fraktionen von Retinol gelöst in DMSO führte nach Auswertung des Lineweaver-Burk-Plots zu ähnlichen Werten ( $K_M$  94,4  $\mu\text{M}$ ,  $v_{\max}$  7,9 pmol/min/mg Protein), allerdings ergab die Bestimmung des  $v_{\max}$ -Wertes aus der Michaelis-Menten-Kinetik eine wesentlich höhere Umsatzgeschwindigkeit ( $v_{\max}$  ca. 16 pmol/min/mg Protein). Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß zwei verschiedene enzymatische Mechanismen an der Reaktion beteiligt sind, wobei ein System Retinol in physiologischen Konzentrationen umsetzt, das andere hingegen erst bei exzessiven Mengen am oxidativen Metabolismus von Retinol beteiligt ist. Bei genauer Betrachtung der Michaelis-Menten-Kinetik der Oxidation von Retinol gelöst in DMSO (s. 4.3.1, Abbildung 4.14) ist zwischen den Substratkonzentrationen 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  eine Stufe zu erkennen. Bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verliefen die Enzymkinetiken von Retinol gelöst in Ethanol oder DMSO ähnlich. Ab einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  waren die Substratumsätze von Retinol in DMSO größer als die in der ethanolischen Lösung. Dieses Phänomen deutet daraufhin, daß bei sehr hohen Retinol-Konzentrationen eine Ethanol-abhängige Dehydrogenase am Metabolismus von Retinol beteiligt ist, die bei Verwendung einer ethanolischen Retinol-Lösung gehemmt wurde. Die Berechnung

## 5 - Diskussion

---

von  $K_M$ - und  $v_{max}$ -Werten mittels Regression nach Lineweaver-Burk berücksichtigt durch das Auftragen reziproker Werte die Substratumsätze bei geringeren Konzentrationen (= hoher, reziproker Wert) wesentlich stärker als die Substratumsätze bei hohen Konzentrationen (= geringer, reziproker Wert). Daher ergaben sich bei Berechnung der kinetischen Daten mittels Lineweaver-Burk-Plot für Retinol in DMSO bzw. Ethanol ähnliche Regressionsgeraden, so daß ein Unterschied bezüglich der Enzymkinetik in dieser Darstellungsform nicht auffiel.

Aufgrund der Ergebnisse ist anzunehmen, daß die Oxidation von Retinol zu all-*trans*-RA bei physiologischen Konzentrationen von einer cytosolischen, Ethanol-unabhängigen Dehydrogenase durchgeführt wird. Diese Vermutung wird vor allem durch Ergebnisse an ADH-negativen Mäusen gefestigt (Posch et al. 1989). Bei diesem Stamm wurde die Ethanol-Dehydrogenase ausgeschaltet. Nach Inkubation cytosolischer Fraktionen aus der Dünndarmmukosa ADH-negativer Mäuse mit physiologischen Konzentrationen Retinol (7,5  $\mu$ M) war die Syntheserate von all-*trans*-RA vergleichbar mit der ADH-positiver Stämme. In anderen Geweben (Leber, Lunge, Niere) waren die Bildungsraten hingegen deutlich reduziert. In den negativen Stämmen wurden Syntheseraten von 5-11,7 pmol/min/mg Protein ermittelt. Werte für einzelne Gewebe wurden nicht angegeben. In einer anderen Arbeit wurde die enzymatische Oxidation von Retinaldehyd zu all-*trans*-RA in Rattengeweben untersucht (Bhat et al. 1988). Dort wurden hohe Aktivitäten in Niere, Testis und Lunge gefunden. In Leber und Dünndarm konnten Enzymaktivitäten nur festgestellt werden, wenn Substratkonzentrationen oberhalb des Sättigungspunktes für die Retinal-Reduktase eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse des *in vitro*-Versuches verdeutlichen, daß Retinol durch cytosolische Enzyme der Darmmukosa des Schweines mit einer den Literaturdaten entsprechenden Umsatzgeschwindigkeit zu all-*trans*-RA metabolisiert wird. Der hohe  $K_M$ -Wert deutet allerdings daraufhin, daß es sich um nicht-spezifische Enzyme mit einer geringen Bindungsaffinität zu den Substraten handelt. Aufgrund der Unterschiede in der Kinetik der Umsetzung von Retinol gelöst in DMSO bzw. Ethanol liegt außerdem die Vermutung nahe, daß zwei voneinander unabhängige Enzymaktivitäten existieren. Eine Aktivität, die durch Ethanol inhibierbar scheint, setzt Retinol erst bei sehr hohen Konzentrationen zu Retinaldehyd um.



### 5.2.2 Intestinaler Metabolismus von Vitamin A *in vivo*

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Unterschiede in der Plasmakinetik von *all-trans*-RA und anderen polaren Metaboliten nach Supplementation oder Leberverzehr durch die Beteiligung des Intestinaltraktes am oxidativen Metabolismus zu erklären wäre. Demzufolge müßte nach Supplementation eine Übersättigung der physiologisch relevanten Metabolismuswege stattfinden, so daß überschüssiges, freies Retinol oxidiert oder anderweitig metabolisiert werden könnte und die erzeugten Metaboliten anschließend über die Portalvene in die Leber und nach hepatischer Clearance in den allgemeinen Blutkreislauf gelangen könnten. Nach Gabe adäquater Vitamin-A-Mengen als Lebermahlzeit wäre aufgrund der verzögerten Verdauung und Resorption keine Übersättigung zu erwarten.

*In vivo*-Experimente, in denen die Rolle des Intestinaltraktes am Metabolismus von Vitamin A beschrieben wurde, beschränkten sich zumeist auf Untersuchungen zur Veresterung absorbierten Retinols und den Weitertransport entstandener Retinylester über die Lymphe (Hollander 1980; Hollander and Muralidhara 1977; Hollander and Dadufalza 1990). Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich mit dem oxidativen Metabolismus von Vitamin A. In einem Frettschen-Modell konnte nach Perfusion eines Dünndarmsegments mit  $\beta$ -Carotin oder Retinaldehyd sowohl in der intestinalen Mukosa als auch in der Portalvene *all-trans*-RA nachgewiesen werden (Hebuterne et al. 1996). Nach Gabe physiologischer Dosen radioaktiv markierten Retinols an Ratten, denen Lymphe, Gallengang und Darm kanüliert wurde, konnten 80% der Radioaktivität in der Lymphe und 20% in der Gallenflüssigkeit wiedergefunden werden (Fidge et al. 1968). Daraus schlossen die Autoren, daß unter normalen Bedingungen geringe Mengen des verabreichten Retinols bereits in der intestinalen Mukosa zu *all-trans*-RA oxidiert und über die Portalvene absorbiert werden. Nach täglicher Gabe von 20  $\mu$ g Retinylacetat über einen Zeitraum von 14 Tagen an Ratten konnten *all-trans*-RA, 13-*cis*-RA, *all-trans*-RAG und polarere Metaboliten in der intestinalen Mukosa detektiert werden (Cullum and Zile 1985). Da kurze Zeit vor der Entnahme der Mukosa der Gallengang kanüliert wurde, vermutete man, daß im Dünndarm nach Gabe physiologischer Dosen Vitamin A RA-Isomere und andere Metaboliten gebildet werden können. In den bisher aufgeführten Arbeiten wurde die Möglichkeit außer Acht gelassen, daß über die Lymphe transportierte Retinylester nach Aufnahme in die Leber metabolisiert werden und erzeugte Metaboliten anschließend nicht über die Galle, sondern über den arteriellen Blutkreislauf in den

## 5 - Diskussion

---

Dünndarm gelangen können. Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experiment sollte diese Möglichkeit berücksichtigen. Daher wurden Blutproben sowohl aus der Portalvene (= Passage zwischen Dünndarm und Leber) und der Zentralvene (= Passage zwischen Leber und Dünndarm) entnommen und die Plasmaspiegel der Retinoid-Metaboliten nach Gabe hoher Vitamin-A-Mengen als Supplement bzw. Leber verglichen. Der Gallengang, der einen weiteren Ausscheidungsweg von in der Leber erzeugten Metaboliten darstellt, wurde in diesem Experiment nicht kanüliert, um den Transport der für die Absorption lipophiler Substanzen wichtigen Gallensäuren in den Dünndarm nicht zu unterbrechen. Da die Möglichkeit bestand, daß in der Leber gebildete Retinoid-Metaboliten über die systemische Blutzirkulation in die intestinalen Blutgefäße gelangen könnten, wurde angenommen, daß nur ein in Portalvenenplasma vorhandener Überschuß an Retinoiden von einem intestinalen Retinoid-Metabolismus herrührt. Durch Subtraktion der AUC-Werte in der Zentralvene von den entsprechenden AUC-Werten in der Portalvene wurden  $\Delta$ AUC-Werte berechnet. Positive  $\Delta$ AUC-Werte sollten einen Hinweis auf die intestinale Bildung von Retinoid-Metaboliten geben, negative  $\Delta$ AUC-Werte hingegen auf eine schnelle Aufnahme von über die Lymphe transportierten Retinoiden in andere Gewebe (s. Tabelle 5.1). Um eine mögliche enterohepatische Rezirkulation über die Galle bewerten zu können, wurden zusätzlich die  $T_{\max}$ -Werte der Retinoide in der Zentralvene verglichen. (s. Tabelle 5.1). Das Auftreten der  $T_{\max}$  eines Metaboliten vor dem der Vorläufersubstanzen (Retinol und Retinylester) wurde als ein weiterer Hinweis darauf angesehen, daß die Metaboliten im Intestinaltrakt gebildet wurden.

Der  $\Delta$ AUC-Wert von Retinol war nach Supplementation positiv, nach Leber-Gabe hingegen negativ. Dieser Unterschied ist ein Hinweis darauf, daß nach Supplementation ein Teil des Retinols über die Portalvene transportiert wird und somit einem *first pass*-Effekt unterliegt. Nach Leber-Gabe scheint dies nicht der Fall zu sein. Der  $\Delta$ AUC-Wert von Retinylpalmitat/-oleat ist in beiden Fällen negativ, so daß ein Transport von Retinylestern über die Portalvene ausgeschlossen werden kann. Der deutlichste Unterschied zwischen Supplementation und Leber-Gabe offenbarte sich in der Portalvenenkinetik von all-*trans*-RA. Nach Supplementation waren die Plasmaspiegel in der Portalvene zu allen Zeitpunkten über denen in der Zentralvene erhöht. Innerhalb von 1,75 h trat in der Portalvene eine Spitzenkonzentration auf, gefolgt von einem zweiten Anstieg der Plasmaspiegel. Letzterer ist durch enterohepatische Rezirkulation von aus der Leber über die

## 5 - Diskussion

Galle ausgeschiedener all-*trans*-RA (oder deren Glukuronid) zu erklären. Der Unterschied in der Bildung von all-*trans*-RA nach Supplementation und Leber-Gabe spiegelte sich auch am  $\Delta AUC$ -Wert wieder, der nach Supplementation deutlich, nach Leber-Gabe hingegen nur geringfügig positiv war. Daß die  $T_{max}$  von all-*trans*-RA nach Supplementation im Plasma der Zentralvene deutlich früher auftrat als die der Vorläufersubstanzen Retinol und Retinylpalmitat/-oleat, ist ein zusätzlicher Hinweis auf einen prähepatischen, intestinalen Metabolismus von Retinol.

Metabolit	<u>Supplementation</u>		<u>Leber-Gabe</u>	
	$\Delta AUC_{0-24h}$	$T_{max}$	$\Delta AUC_{0-24h}$	$T_{max}$
	(ng*h/ml)	(h)	(ng*h/ml)	(h)
Retinol	907	3,0	-1076	3,5
Retinylpalmitat/-oleat (16:0/18:1)	-2178	3,0	-8513	3,5
All- <i>trans</i> -RA	30,0	1,75	1,3	2,5
13- <i>cis</i> -RA	16,3	2,0	-13,8	3,0
All- <i>trans</i> -RAG	36,7	3,0	37,6	4,5
ROG	231,4	2,5	29,7	7,0

Tabelle 5.1: Vergleich der  $\Delta AUC$ - (=  $AUC_{Portalvene} - AUC_{Zentralvene}$ ) und  $T_{max}$ -Werte (Zentralvene) von Retinoiden nach Gabe von Vitamin A als Supplement oder als Leber.

Bei 13-*cis*-RA war nach Supplementation ein der Kinetik von all-*trans*-RA entsprechender Verlauf zu erkennen, allerdings war der resultierende  $\Delta AUC$ -Wert etwas geringer. Ein Vergleich der Kinetik von all-*trans*-RA und 13-*cis*-RA nach Supplementation zeigte, daß all-*trans*-RA nach dem Erreichen der maximalen Konzentration sehr schnell eliminiert wurde, wohingegen 13-*cis*-RA-Spiegel über einen längeren Zeitraum erhöht blieben. All-*trans*-RA unterlag offensichtlich einer sehr effizienten hepatischen Clearance (*first pass*-Effekt). Diese Phänomen war bei 13-*cis*-RA nicht so ausgeprägt.

Im Plasma des Schweines konnten außerdem die Glukuronide von all-*trans*-RA (all-*trans*-RAG) und Retinol (ROG) sowohl nach Supplementation als auch nach Lebergabe nachgewiesen werden. Die AUC- und  $C_{max}$ -Werte von all-*trans*-RAG waren in beiden Fällen in der Portalvene

## 5 - Diskussion

---

höher als in der Zentralvene, was sich auch in den  $\Delta\text{AUC}$ -Werten widerspiegelt. Die  $T_{\text{max}}$  von all-*trans*-RAG, die später als die von all-*trans*-RA auftrat, deutete auf eine mögliche enterohepatische Rezirkulation von in der Leber erzeugtem all-*trans*-RAG hin. Die Glukuronidierung von Retinol zu ROG wies nach Supplementation und Leber-Gabe deutliche Unterschiede auf. Zunächst traten nach Lebergabe geringere Plasmaspiegel auf als nach Supplementierung. Außerdem trat die  $C_{\text{max}}$  von ROG nach Supplementation in der Zentralvene wesentlich früher auf als nach Lebergabe. Ein Unterschied in der Kinetik machte sich bei Betrachtung der  $\Delta\text{AUC}$ -Werte für ROG bemerkbar. Die deutliche Differenz nach Supplementation (231,4 ng·h/ml) und die frühe  $T_{\text{max}}$  waren auf eine intestinale Glukuronidierung überschüssigen Retinols zurückzuführen. Dieser Metabolismus-Schritt würde auch erklären, warum der oxidative Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA nicht so ausgeprägt war. Bisher gab es keine Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A im Schwein, allerdings sind auch andere Spezies (Affe, Kaninchen) beschrieben, bei denen nach Vitamin-A-Gabe eine Glukuronidierung von Retinol stattfand (Eckhoff et al. 1990; Tzimas et al. 1996). Beim Menschen ist das Auftreten von ROG im Plasma nach Vitamin-A-Gabe nicht bekannt.

### 5.2.3 Schlußfolgerungen

Durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente wurde der Nachweis erbracht, daß nach Gabe hoher Vitamin-A-Dosen ein oxidativer Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA bereits in intestinalen Geweben stattfinden kann. Nach Vitamin-A-Supplementation eines Schweines konnte durch Vergleich der Plasmaspiegel in Portalvene und Zentralvene außerdem gezeigt werden, daß die intestinal gebildeten Metaboliten innerhalb des Organismus weitertransportiert wurden. Aufgrund der im Vergleich zu den Vorläufersubstanzen (Retinol und Retinylester) sehr frühen  $T_{\text{max}}$ -Werte von all-*trans*-RA bzw. 13-*cis*-RA konnte eine enterohepatische Rezirkulation von in der Leber produzierten RA-Isomeren über den Gallengang in den Dünndarm nicht für die anfängliche Spitzenkonzentration verantwortlich sein.

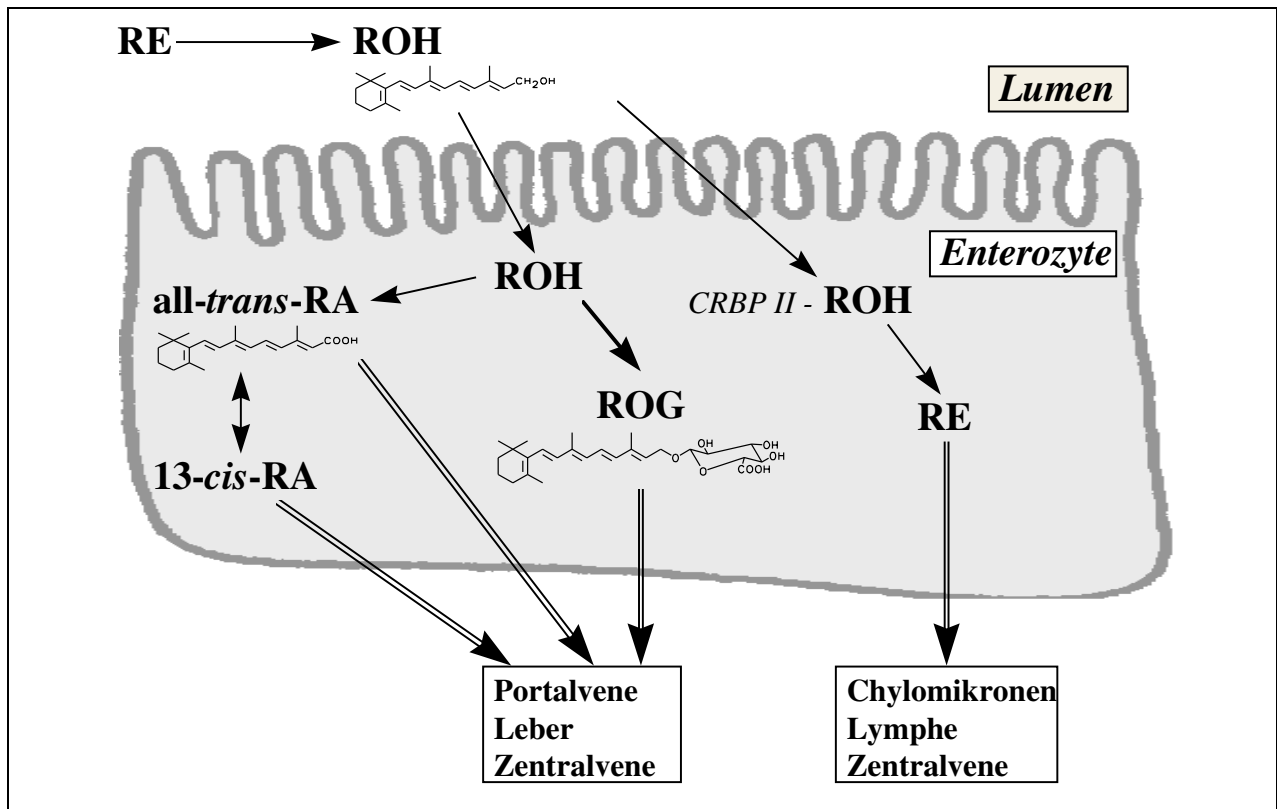


Abbildung 5.2: Intestinaler Metabolismus ungebundenen Retinols im Schwein nach Gabe hoher Vitamin-A-Mengen als Supplement. CRBP II-gebundenes Retinol (ROH) wird zu Retinylestern (RE) metabolisiert und in Chylomikronen an die Lymphe abgegeben, freies Retinol wird größtenteils zu Retinylglukuronid (ROG) umgesetzt oder zu all-trans-RA bzw. 13-cis-RA oxidiert und an die Portalvene abgegeben.

Da ein solches Ergebnis nach Gabe einer adäquat hohen Vitamin-A-Menge als Leber nicht nachvollzogen werden konnte, ist zu vermuten, daß die Übersättigung der physiologisch wichtigen Wege der Veresterung von exogenem Vitamin A und des Transports über die Lymphe Voraussetzung für einen oxidativen Metabolismus-Schritt sind.

Aufgrund der im Schwein offensichtlich sehr effizienten hepatischen Clearance von intestinal gebildeter all-trans-RA konnten nur geringe Konzentrationen in der Zentralvene gemessen werden, so daß sich die Zentralvenenkinetik dieses Metaboliten nach Supplementation und Leber-Gabe nicht so deutlich unterschied. Ein weiterer Grund dafür war, daß ein Großteil des im Intestinaltrakt ungebunden vorliegenden Retinols nicht oxidativ umgesetzt, sondern glukuronidiert wurde (s. Abbildung 5.2).

Das Schwein erwies sich in diesem Experiment als Modell nur eingeschränkt geeignet. Der Omnivoren-Status des Schweins erlaubte die Verabreichung von Leber. Die Größe des Tieres und

damit die Verfügbarkeit von Blutplasma zur Erstellung von Kinetiken war ein weiterer Vorteil. Zwar zeigten sich auch Übereinstimmungen im endogenen Retinoid-Status zwischen Mensch und Schwein, der Metabolismus von exogen verabreichtem Vitamin A wies jedoch Unterschiede auf. Im Vergleich zum Menschen und auch zu anderen Tierspezies war der oxidative Metabolismus zu den aktiven Retinsäuren nicht sehr ausgeprägt, so daß die all-*trans*-RA-Spiegel trotz Gabe hoher Vitamin-A-Dosen niedrig waren. Ähnlich wie in anderen Tierspezies aber im Gegensatz zum Menschen wurde ein Teil der verabreichten Vitamin-A-Dosis durch Glukuronidierung zu ROG metabolisiert und stand somit für die Oxidation zu all-*trans*-RA nicht zur Verfügung. Für eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse wäre es sinnvoll, dieses Experiment mit einer höheren Anzahl von Tieren und eventuell auch mit einer wesentlich höheren Dosis zu wiederholen. Die Komplexität der operativen Eingriffe und der damit verbundene zeitliche Aufwand ließen diese Möglichkeit im Rahmen der Arbeit nicht zu.

Die in der Arbeit von Buss et al. (1994) aufgezeigten Unterschiede in der Plasmakinetik von all-*trans*-RA nach Vitamin-A-Aufnahme durch Supplementation bzw. Leberverzehr beim Menschen finden durch dieses Experiment ihre Erklärung. Ein Vergleich der Gabe gleich hoher Dosen Vitamin A durch Supplementation oder Leberverzehr, wie er von Buss et al. (1994) zur Abschätzung eines teratogenen Risikos nach Leberverzehr durchgeführt wurde, stellt sich aufgrund dieser Ergebnisse als wenig sinnvoll heraus.

### **5.3 Abschätzung eines teratogenen Risikos durch Leberverzehr**

In 5.1.2 und 5.1.3 wurde bereits ausführlich dargelegt, was über die nach Verzehr einer Lebermahlzeit auftretenden Retinoid-Metaboliten bezüglich ihrer Wirkung *in vivo* bzw. *in vitro* bekannt ist. Auf Basis dieser Ergebnisse soll in diesem Abschnitt eine Risikoabschätzung durchgeführt werden. Als weitere Grundlage dienen tierexperimentelle Teratogenitäts-Studien, Humanstudien zum Metabolismus von Vitamin A sowie epidemiologische Studien zur Korrelation der täglichen Vitamin-A-Aufnahme mit möglichen, teratogenen Wirkungen beim Menschen.

### 5.3.1 Extrapolation tierexperimenteller Untersuchungen zur Teratogenität und Pharmakokinetik von Retinoiden

Experimentelle Studien haben in den letzten Jahrzehnten ausführlich belegt, daß hohe Vitamin-A-Mengen in vielen Spezies teratogen sind (Rosa et al. 1986; Nau et al. 1994). Die niedrigsten Dosen zur Erzielung teratogener Effekte wurden beim Kaninchen (5 mg/kg/Tag) und Affen (16 mg/kg/Tag) beobachtet. Es gibt Hinweise darauf, daß Vitamin A (Retinol) selbst oder seine Hauptmetaboliten als aktive Agenzien entweder nach Einzel- oder nach Mehrfachdosierung an verschiedenen Tagen während der Organogenese wirken können. Die offensichtlichen Speziesunterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber teratogenen Effekten von Vitamin A sind hauptsächlich auf Unterschiede in Metabolismus und Kinetik zurückzuführen. Ein Vergleich von Metabolismus und Kinetik zwischen Menschen und verschiedenen Tierspezies zeigte, daß Nager (Mäuse, Ratten) nur unzureichende Modelle darstellen (Eckhoff and Nau 1990; Eckhoff et al. 1989; Collins et al. 1994; Arnhold et al. 1996; Tzimas et al. 1996). In Mäusen wurde Vitamin A überwiegend zu *all-trans*-RA und anderen polaren Metaboliten (*all-trans*-4-oxo-RA und 14-HRR) verstoffwechselt. In Ratten trat überwiegend 14-HRR auf, RA-Isomere wurden nur in sehr geringem Umfang gebildet. Außerdem waren in diesen Spezies endogene Plasmaspiegel an Retinol geringer und Konzentrationen an Retinylestern wesentlich höher als beim Menschen. Retinoid-Plasma-Profile waren sowohl endogen als auch nach Gabe von Vitamin A zwischen Kaninchen und Mensch sehr ähnlich (Eckhoff and Nau 1990; Tzimas et al. 1996; Arnhold et al. 1996). Plasma-AUC-Werte nach Gabe teratogener Vitamin-A-Dosen beim Kaninchen bzw. nach Supplementation beim Menschen offenbarten vergleichbare Werte. In beiden Fällen fand ein sehr geringer Anstieg der endogenen Spiegel statt (1,4-fach). Auch das Metabolitenmuster zeigte dahingehend Übereinstimmungen, daß überwiegend *cis*-Isomere der polaren Metaboliten gebildet wurden: Beim Kaninchen überwog die Bildung von 9,13-di-*cis*-RA gefolgt von 13-*cis*-4-oxo-RA und 13-*cis*-RA, beim Menschen wurden hauptsächlich 13-*cis*-4-oxo-RA gefolgt von 13-*cis*-RA und 9,13-di-*cis*-RA gebildet. Ein weiteres Merkmal beim Kaninchen war, daß *all-trans*-RA in sehr geringen Konzentrationen in maternalem Plasma auftrat, aber in sehr großem Umfang im Embryo/Fetus akkumulierte (Tzimas et al. 1996). Auch wenn beim Menschen nichts über eine mögliche Akkumulation von *all-trans*-RA im Embryo/Fetus bekannt ist, könnte aufgrund der Ähnlichkeit der Plasmaprofile zwischen Mensch und Kaninchen eine solche Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden.

## 5 - Diskussion

---

Teratogenitäts-Studien in Makaken nach Gabe von all-*trans*-RA (Tretinoin) oder 13-*cis*-RA (Isotretinoin) ließen vermuten, daß der Affe dem Menschen in Bezug auf die induzierten Effekte sehr ähnlich ist (Lammer et al. 1985; Hummler et al. 1990; Korte et al. 1993; Hendrickx and Hummler 1992). Die Isotretinoin-Dosen, die beim Menschen und Affen teratogene Effekte hervorriefen, befanden sich innerhalb einer Größenordnung (0,5 mg/kg beim Menschen, 2,5-5 mg/kg beim Affen). Auch der Metabolismus von Isotretinoin zeigte Gemeinsamkeiten (Hummler et al. 1994).

Auch wenn Nager nicht die idealen Spezies darstellen, um Retinoid-induzierte, teratogene Effekte mit der humanen Situation zu vergleichen, so ist aus den Untersuchungen an Mäusen hervorzuheben, daß auch Retinol selbst teratogene Effekte ausüben kann (Collins et al. 1992). Inwieweit dieses Phänomen auf einen unkontrollierten, passiven Übergang von Retinol über die plazentare Barriere in den Mausembryo zurückzuführen ist, kann nicht beantwortet werden. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals festgestellt werden, daß die homöostatisch streng kontrollierten Plasmaspiegel an Retinol nach Vitamin-A-Gabe signifikant erhöht waren. Weiterhin war die Bindungskapazität des Plasmaproteins RBP zu einigen Zeitpunkten nach Leberverzehr deutlich erschöpft. Es ist daher zu vermuten, daß nach Einnahme hoher Vitamin-A-Mengen ein Teil des Plasmareservoirs an Retinol nicht an RBP gebunden, sondern in Lipidfraktionen vorliegt. Solche Lipidfraktionen dienen auch dem sich entwickelnden Embryo als Quelle essentieller Nährstoffe. Ein Übergang exzessiver Mengen Retinol zum Embryo kann daher nicht ausgeschlossen werden.



### 5.3.2 Vergleich mit epidemiologischen und experimentellen Humanstudien

Bisher sind beim Menschen 24 Fälle von Geburtendefekten mit der Aufnahme hoher Vitamin-A-Dosen in Verbindung gebracht worden (Rosa et al. 1986; Rosa 1993). Bis auf einen Fall lag hierbei eine tägliche Vitamin-A-Aufnahme von mindestens 25.000 IU während der gesamten Schwangerschaft oder zumindestens während des ersten Trimesters vor. In vielen Berichten wurden Geburtendefekte protokolliert, die denen früher berichteter Mißbildungen in Tierspezies oder auch beim Menschen nach Isotretinoin-Therapie glichen. In einer Fall-kontrollierten, epidemiologischen Erhebung wurden Mütter von Säuglingen mit oder ohne kongenitale Anomalien in Bezug auf ihre Vitamin-A-Aufnahme befragt (Martinez and Salvador 1990). Nur bei Aufnahme von mehr als 40.000 IU täglich über reine Vitamin-A-Supplemente offenbarte sich ein erhöhtes Risiko. In einer ebenfalls Fall-kontrollierten Studie wurde im ersten Monat der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für von der Neuralleiste abgeleitete Schädelmißbildungen (*cranial-neural crest cell defects*) nach Einnahme von Supplementen festgestellt (Werler et al. 1990). Allerdings konnten keine genauen Dosen angegeben werden, die Aufnahmen schwankten zwischen 5.000 IU und 25.000 IU Vitamin A. In einer anderen Studie wurden werdende Mütter während der Schwangerschaft über ihre Vitamin-A-Aufnahme befragt und ihre Schwangerschaft über den gesamten Zeitraum verfolgt. Bei schwangeren Frauen, die mehr als 15.000 IU pro Tag (als Supplement oder Nahrungsbestandteil) aufnahmen, war das Risiko des Auftretens von Schädelmißbildungen bei Neugeborenen gegenüber Frauen, die täglich nur 5.000 IU aufnahmen, deutlich erhöht (Rothman et al. 1995). Da nur wenige Frauen mehr als 10.000 IU täglich ausschließlich über die Nahrung aufnahmen, konnte über das Risiko von Vitamin A durch Leberverzehr keine Aussage gemacht werden. Dennoch gab es zwei Fälle von Mißbildungen, die auf die alleinige Aufnahme von mehr als 10.000 IU Vitamin A über die Nahrung zurückzuführen waren. Die Autoren legten auf Grundlage ihrer Daten einen Schwellenwert von 10.000 IU Vitamin A/Tag fest. In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurden Fälle von Gesichts- und Herzmißbildungen protokolliert, indem Mütter im Durchschnitt 3,5 Jahre nach der Geburt befragt wurden (Shaw et al. 1996). Es konnte im Gegensatz zu den bereits erwähnten Studien kein erhöhtes Risiko durch eine Vitamin-A-Aufnahme von 10.000 IU pro Tag festgestellt werden. Aufgrund aller epidemiologischen Erhebungen läßt sich dennoch ein teratogenes Risiko bei einer täglichen Aufnahme von 10.000-25.000 IU Vitamin A nicht gänzlich ausschließen.

## 5 - Diskussion

---

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten pharmakokinetischen Parameter wurden mit in der Literatur beschriebenen Daten nach Supplementation (Eckhoff and Nau 1990; Eckhoff and Nau 1990; Buss et al. 1994; Chen et al. 1996) bzw. Leberverzehr (Buss et al. 1994) verglichen (s. Tabelle 5.2). Ein Vergleich der Leberverzehr-Studien zeigte, daß auch nach Einnahme von 500.000 IU Vitamin A durch Leberverzehr all-*trans*-RA-Spiegel nur marginal anstiegen. Von den  $C_{\max}$ -Werten der all-*trans*-RA war lediglich der Wert nach Supplementation von 500.000 IU Vitamin A auffällig (Buss et al. 1994). Daß diese sehr hohen Plasmaspiegel vermutlich aufgrund eines intestinalen Metabolismus überschüssigen Retinols hervorgerufen wurde, konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Versuche am Schwein belegt werden. Nach Supplementation mit niedrigeren Dosen, die allerdings schon im Risikobereich lagen (10.000 - 25.000 IU), waren die all-*trans*-RA-Spiegel nach chronischer Gabe (über einen Zeitraum von 60 Tagen) wie auch nach einmaligem Leberverzehr nur geringfügig erhöht (Chen et al. 1996). Die einmalige Supplementation mit ca. 50.000 IU (Eckhoff and Nau 1990; Eckhoff and Nau 1990) führte zu all-*trans*-RA-Spiegeln ( $3,5 \pm 1,6$  ng/ml), die mit denen nach Einnahme von 500.000 IU durch Leberverzehr (Buss et al. 1994) vergleichbar waren ( $4,1 \pm 1,0$  ng/ml). Im Gegensatz dazu waren die 13-*cis*-RA- und 13-*cis*-4-oxo-RA-Spiegel gemessen an den  $C_{\max}$ - und  $\Delta AUC$ -Werten nach Leberverzehr deutlich höher als nach Supplementation physiologischer Vitamin-A-Dosen. Nach chronischer Supplementation von 10.000 IU oder 25.000 IU (Chen et al. 1996) waren die  $\Delta AUC$ -Werte für all-*trans*-RA wie auch nach Leberverzehr (diese Studie) nur geringfügig erhöht oder sogar negativ, da die Plasmaspiegel unter endogene Werte sanken.

Der Einfluß einer chronischen Supplementierung auf Retinol und Retinylesterspiegel wurde nicht untersucht (Chen et al. 1996). Nach einmaliger Supplementation sehr hoher Dosen stiegen Retinolspiegel ebenso wie nach Leberverzehr über endogene Werte an (Buss et al. 1994), dieser Anstieg war den Autoren zufolge allerdings nicht signifikant. Im Rahmen dieser Arbeit konnte hingegen eine signifikante Erhöhung der Retinolspiegel festgestellt werden, die sogar mit einem molaren Überschuß von Retinol über das Plasma-Bindungsprotein RBP einherging. RBP-Konzentrationen wurden beim Menschen nur in einer anderen Studie gemessen (Eckhoff and Nau 1990; Eckhoff and Nau 1990). Dort wurde nach Supplementation von 50.000 IU zu jedem Zeitpunkt ein 16-34%iger Überschuß von RBP festgestellt.

Retinoid	Parameter	Diese Studie <sup>a</sup> 3.300 IU/kg KG (L)	Chen et al. 1996 <sup>b</sup> 10.000 IU (S)	Chen et al. 1996 <sup>b</sup> 25.000 IU (S)	Eckhoff et al. 1990 <sup>c</sup> 833 IU/kg KG (S)	Buss et al. 1994 <sup>d</sup> 500.000 IU (S)	Buss et al. 1994 <sup>d</sup> 500.000 IU (L)
All- <i>trans</i> -RA	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,6
	C <sub>max</sub> (ng/ml)	2,0 ± 0,5	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,4	3,5 ± 1,6	87,4 ± 60,6	4,1 ± 1,0
	ΔAUC <sup>e</sup> (ng*h/ml)	1,25 ± 4,7	0,6 ± 2,5	-0,5 ± 3,0	4,1 ± 0,6 <sup>f</sup>	170,0 ± 118,3	22,6 ± 10,6
13- <i>cis</i> -RA	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,6 ± 0,9	1,4 ± 0,7	1,4 ± 0,7
	C <sub>max</sub> (ng/ml)	21,5 ± 4,3	1,9 ± 0,4	2,4 ± 0,8	8,4 ± 3,9	67,9 ± 28,8	30,9 ± 7,4
	ΔAUC (ng*h/ml)	178,3 ± 33,5	14,1 ± 4,6	17,6 ± 5,5	21,3 ± 9,0 <sup>f</sup>	674,4 ± 155,6	596,4 ± 130,6
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)	2,4 ± 0,6	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,7	3,7 ± 1,0	2,1 ± 0,7	2,1 ± 0,7
	C <sub>max</sub> (ng/ml)	32,1 ± 4,9	3,4 ± 0,7	4,8 ± 0,9	6,7 ± 2,5	63,6 ± 14,7	43,0 ± 10,7
	ΔAUC (ng*h/ml)	379,2 ± 63,0	32,3 ± 12,7	51,8 ± 12,2	16,9 ± 5,9 <sup>f</sup>	2385 ± 563	1820 ± 294
Retinol	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)	641 ± 99	keine Angaben	keine Angaben	467 ± 88,8	730 ± 280	670 ± 250
	C <sub>max</sub> (ng/ml)	800 ± 105			-	980 ± 310	940 ± 260
	ΔAUC (ng*h/ml)	1436 ± 1543			-	2300 ± 1180	2430 ± 2090
Retinylpalmitat/ -oleat (16:0/18:1)	C <sub>endogen</sub> (ng/ml)	32,2 ± 19,1	keine Angaben	keine Angaben	33,5 ± 14,7	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
	C <sub>max</sub> (ng/ml)	3540 ± 1736			1977 ± 1447	3100 ± 2700	2300 ± 1500
	ΔAUC (ng*h/ml)	21311 ± 7371			-	18900 ± 20200	14500 ± 8800

a Einmalig ca. 1 mg Retinol/kg KG als Lebermahlzeit (absolut ca. 267.000 IU); n=10 (männlich); Kinetik (= AUC-Bestimmung) über 24 h.

b 10.000 IU oder 25.000 IU Retinol als Supplement täglich über einen Zeitraum von 60 Tagen; n=7-8 (weiblich); Kinetik über 168 h nach letzter Gabe.

c Einmalig 833 IU/kg KG als Supplement (absolut ca. 50.000 IU); n=6 (männlich); Kinetik über 6 h.

d Einmalig 150 mg Retinol (500.000 IU) als Supplement oder Lebermahlzeit; n=10 (weiblich); Kinetik über 144 h, Extrapolation des AUC-Wertes.

e  $\Delta AUC = AUC_{xh} - [x \cdot c_{endogen}]$

f Aus den Literaturangaben berechnet.

Tabelle 5.2: Vergleich kinetischer Parameter von Humanstudien zum Metabolismus von Vitamin A nach Supplementation (S) oder Leberverzehr (L).

Der Vergleich dieser Ergebnisse zeigt, daß nach Verzehr einer durchschnittlichen Lebermahlzeit Plasmaspiegel aktiver Vitamin-A-Metabolite auftraten, die mit denen nach chronischer Supplementation vergleichbar waren (*all-trans*-RA) oder diese sogar noch übertrafen (*13-cis*-RA, *13-cis-4-oxo*-RA). Weiterhin fand nach Leberverzehr ein signifikanter Anstieg der Retinolspiegel über endogene Werte an, der sogar die Kapazität des spezifischen Trägerproteins RBP im Plasma übertraf. Dieses Phänomen wurde bisher nicht beobachtet oder nicht beachtet.

### 5.3.3 Schlußfolgerungen

*All-trans*-RA ist in fast allen Spezies das aktivste Teratogen aller natürlichen Retinoide (Soprano and Soprano 1995). *13-cis*-RA - verabreicht als Therapeutikum Isotretinoin - ist beim Menschen nachweislich teratogen. Eine mögliche teratogene Wirkung der 4-oxo-Metaboliten dieser RA-Isomere kann aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Der RXR-Agonist *9-cis*-RA, erstmals nach Vitamin-A-Gabe in Humanplasma detektiert, erwies sich in Nagern ebenfalls als teratogen (Kochhar et al. 1995). In Mäusen zeigte sich nach Gabe von Vitamin A, daß auch Retinol selbst schädigende Wirkungen ausüben kann (Collins et al. 1992).

Aus epidemiologischen Studien konnte ein Schwellenwert von 10.000-25.000 IU Vitamin A/Tag für ein erhöhtes, teratogenes Risiko festgelegt werden. Eine durchschnittliche Lebermahlzeit kann die 10- bis 30-fache Menge dieser Schwellendosis enthalten. Ein Vergleich des Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr bzw. Supplementation hat gezeigt, daß aktive Vitamin-A-Metaboliten nach Leberverzehr in vergleichbaren oder sogar höheren Mengen gebildet werden als nach chronischer Supplementation. Sogar homöostatisch kontrollierte Retinol-Spiegel waren nach Leberverzehr im Plasma erhöht. Der molare Überschuß an Retinol über dem Plasmaprotein RBP deutet daraufhin, daß sich ein Teil des Plasmapools an Retinol nach Leberverzehr in Lipidfraktionen befinden könnte. Diese Lipidfraktionen könnten unter Umständen auch embryonales Gewebe erreichen. Die zusätzliche Identifizierung weiterer, aktiver Vitamin-A-Metabolite (*9-cis*-RA, *9,13-di-cis*-RA, *14-HRR*) in Humanplasma nach Leberverzehr läßt zusammen mit dem hier durchgeführten Vergleich der Plasma-Exposition mit bereits bekannten Metaboliten den Schluß zu, daß der Verzehr einer Lebermahlzeit in der Schwangerschaft sicherlich kein geringeres teratogenes Risiko mit sich bringt als eine Vitamin-A-Supplementation mit 10.000-25.000 IU Vitamin A pro Tag.

### 5.4 Phytansäure/Phytol als Synergisten Retinoid-induzierter Teratogenität

#### 5.4.1 Teratogenitäts-Untersuchungen

Synergistische Effekte synthetischer RXR-Liganden auf die Wirkung von RAR-Liganden sind in Reporter-gen-Assays, in Zellsystemen und auch bezüglich der teratogenen Wirkung auf Zebrafisch- und Xenopus- und Mausembryonen beschrieben (Minucci et al. 1997). In P19-Embryo-Karzinomazellen trat die synergistische Wirkung eines RXR-Liganden auf die Transkription des RAR $\beta$ -Gens nur bei suboptimalen Konzentrationen des jeweiligen RAR-Liganden auf (Minucci et al. 1997). Selektive Liganden für RAR $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  konnten ebenso wie RXR-spezifische Liganden die Expression von Zielgenen in P19- und F9-Embryo-Karzinomazellen nicht beeinflussen, wenn sie in geringen Konzentrationen einzeln verabreicht wurden. Wurden RAR- und RXR-Liganden in vergleichbaren Konzentrationen zusammen gegeben, so trat eine Induktion der Expression von Zielgenen und der Zelldifferenzierung auf (Roy et al. 1995). Synergistische Effekte des RXR-Liganden Phytansäure auf die Wirkungen des natürlichen RAR-Liganden *all-trans*-RA oder seines Vorläufers Retinol sind bisher nicht beschrieben worden.

Bei gleichzeitiger Gabe einer mittleren, teratogenen Dosis *all-trans*-RA (RA, 20 mg/kg KG) und Phytansäure (PA, 100 mg/kg KG) oder Phytol (POH, 500 mg/kg KG) an Mäuse trat keine signifikante Potenzierung der durch *all-trans*-RA induzierten, äußerlich sichtbaren Mißbildungen auf. Wie in Abbildung 5.3 verdeutlicht, steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den beschriebenen Synergismen bezüglich teratogener Wirkungen des natürlichen RAR-Liganden *all-trans*-RA (RA) und des synthetischen RXR-Liganden LG1069 bzw. des synthetischen RAR $\alpha$ -Liganden Am580 und Phytansäure (Elmazar and Nau 1998). Sowohl Spina bifida- (SB) als auch Exenzephalieraten (EX) stiegen bei gleichzeitiger Verabreichung von RA und LG1069 deutlich an. Dies war bei gleichzeitiger Gabe von PA oder POH statt LG1069 nicht der Fall, die Mißbildungsraten blieben nahezu unverändert. Eine Ausnahme bildeten Resorptionen (RS) und Schwanzmißbildungen (SM), die nach Gabe von RA und POH sogar zurückgingen oder gar nicht mehr auftraten.

## 5 - Diskussion

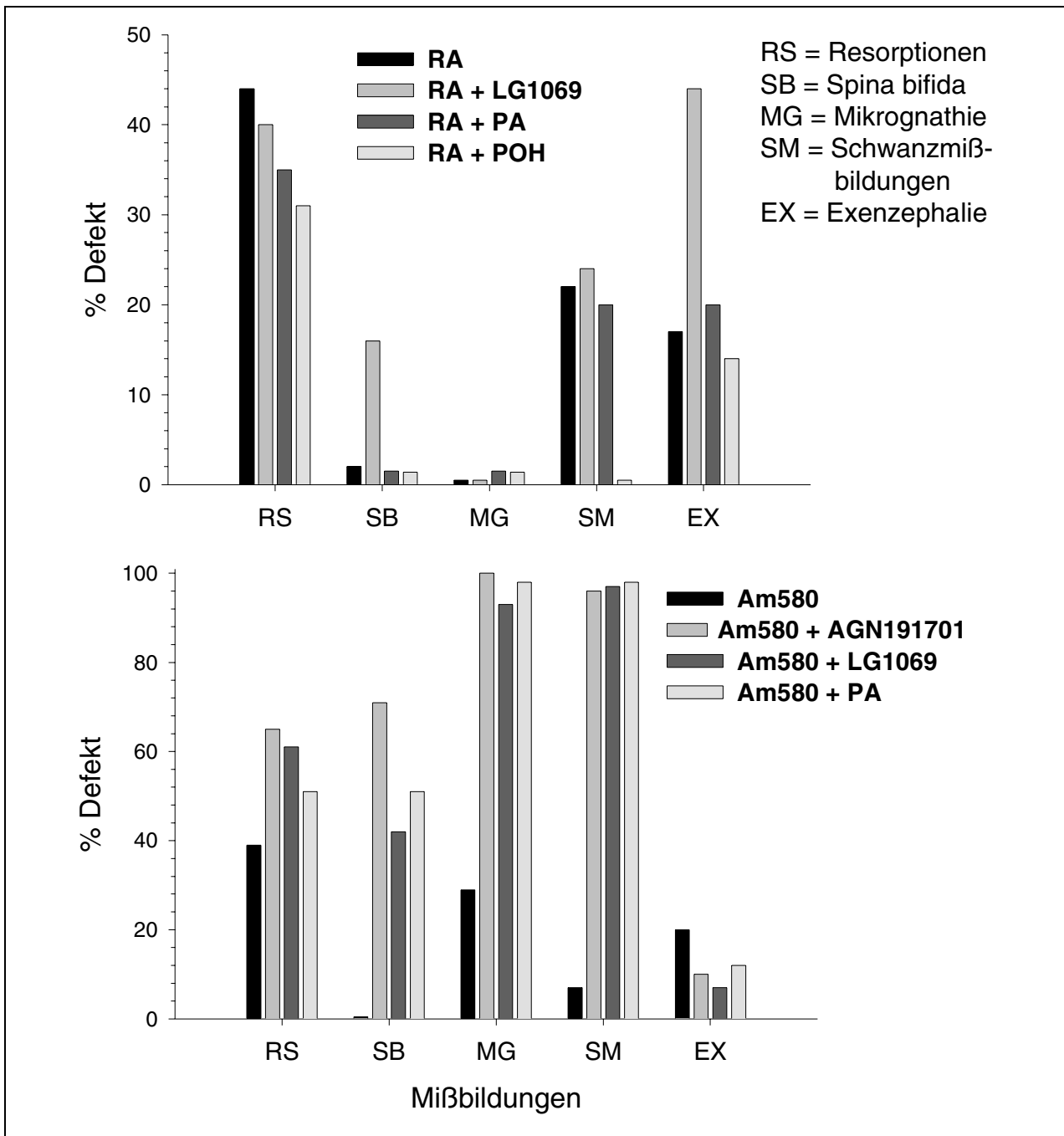


Abbildung 5.3: Synergistische, teratogene Effekte in der Maus nach gleichzeitiger Gabe von RAR- und RXR-Liganden an GD 8,25.

Die synergistischen Effekte von PA wurden hingegen bei Gabe des RAR $\alpha$ -Liganden Am580 anstelle von all-*trans*-RA (RA) sehr deutlich. Resorptioenen (RS), Spina bifida (SB), Mikrognathie (MG) und Schwanzmißbildungen (SM) waren in Übereinstimmung mit den Effekten nach Gabe der synthetischen RXR-Liganden AGN191701 und LG1069 erhöht.

Exenzephalieraten (EX) waren dagegen geringfügig verringert. Dieser Effekt ist damit zu erklären, daß an der Auslösung von Exenzephalie RAR $\gamma$  beteiligt zu sein scheint (Elmazar et al. 1997), so daß der Einfluß des affinen RAR $\alpha$ -Liganden Am580 vernachlässigbar ist. All-*trans*-RA bindet an alle RAR-Subtypen mit einer ähnlichen Bindungsaffinität, so daß dieser natürliche Ligand sowohl RAR $\alpha$ - (Spina bifida) als auch RAR $\gamma$ -vermittelte (Exenzephalie) teratogene Effekte auslösen kann.

Synergistische Effekte von POH und ROH sind in Bezug auf das *in vitro*-Zellwachstum von murinen Leukämiezellen beschrieben (Suzuki et al. 1998), es ist jedoch nicht untersucht worden, ob diese Wirkungen über Rezeptoren vermittelt wurde. Der RXR-Agonist LG1069 vermochte die durch ROH induzierten Resorptionen, Spina bifida, Schwanzmißbildungen sowie Exenzephalie in der Maus potenzieren (Elmazar und Nau 1998). Die gleichzeitige Verabreichung von POH oder PA und ROH führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Resorptionen sowie zu einer kompletten Aufhebung Retinol-induzierter Mißbildungen.

### 5.4.2 Kinetik, Metabolismus und embryonale Exposition

Die endogenen Retinoid-Konzentrationen wiesen zwischen nichtträchtigen und trächtigen Mäusen (GD 11) Unterschiede auf. In nichtträchtigen Mäusen waren sowohl Retinol als auch Retinylpalmitat/-oleat im Vergleich zu den entsprechenden Werten in trächtigen Tieren erhöht. Dieser Unterschied wurde bereits in beschrieben (Sass et al. 1995). In einer Studie von Satre et al. (1992) wurde bei ICR-Mäusen während der Trächtigkeit ebenfalls eine Abnahme der Plasmaspiegel an Retinol beobachtet. Der Grund für dieses Absinken ist nicht bekannt, es wird aber angenommen, daß dieses Phänomen durch das erhöhte Verteilungsvolumen sowie durch einen erhöhten Retinol-Bedarf der Embryonen zu erklären ist. Auch die in embryonalem Gewebe quantifizierten endogenen Retinoide stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein (Eckhoff et al. 1989; Tzimas et al. 1995). Lediglich die Identifizierung von all-*trans*-4-oxo-RA als endogener Metabolit ist im Fetus noch nicht beschrieben. Aufgrund der geringen Konzentrationen war eine Bestätigung der Identifizierung mittels LC-MS nicht möglich.

## 5 - Diskussion

---

Neben den Bindungsaffinitäten von *all-trans*-RA oder synthetischen Retinoiden an Rezeptor-Subtypen spielen auch kinetische Parameter dieser Substanzen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung teratogener Effekte. Im Vergleich zu synthetischen Retinoiden wird *all-trans*-RA wesentlich schneller eliminiert. Untersuchungen zur Plasmakinetik von Am580 in Mäusen haben gezeigt, daß diese Substanz im Gegensatz zu *all-trans*-RA kaum metabolisiert wird. Die gleichzeitige Gabe von PA hatte außerdem keinen Einfluß auf die Kinetik von Am580, so daß die Plasma-AUC-Werte nahezu unverändert blieben (Elmazar et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Es konnte gezeigt werden, daß der AUC-Wert ein für die teratogene Wirkung von Retinoiden entscheidender Korrelationsparameter ist (Tzimas et al. 1997; Nau 1994). Auch wenn embryonale AUC-Werte sicherlich bessere Bewertungsparameter für die teratogene Potenz von Retinoiden darstellen, so konnte in Bezug auf die Teratogenität von *all-trans*-RA in Nagern auch eine sehr gute Korrelation zwischen Plasma-AUC und teratogener Wirkung festgestellt werden (Tzimas et al. 1997). Diese Korrelation war darauf zurückzuführen, daß die Verteilung von *all-trans*-RA zwischen Embryo und maternalem Plasma unabhängig von der Applikationsart sehr ähnlich war. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist nach gleichzeitiger Gabe von RA zusammen mit POH bzw. PA ein Einfluß auf  $C_{\max}$ - und AUC-Werte (berechnet bis 4 h) von *all-trans*-RA im Plasma deutlich, wenn auch statistisch nicht signifikant. Die Gabe von POH führte zu einer Reduzierung des Plasma-AUC und des  $C_{\max}$ -Wertes von *all-trans*-RA um 46 % bzw. 34 %. Nach gleichzeitiger Administration von PA wurde der Plasma-AUC-Wert von *all-trans*-RA um 56 % und der  $C_{\max}$ -Wert um 14 % reduziert. Es ist anzunehmen, daß diese Reduktion der Verfügbarkeit von *all-trans*-RA im maternalen Plasma mit einem geringeren plazentaren Transfer von *all-trans*-RA zum Embryo einhergeht. Die maternale und embryonale Exposition wurde 4 h nach Gabe von RA allein oder mit POH bzw. PA verglichen. Nach gleichzeitiger PA-Gabe waren sowohl die Plasma- als auch die Embryospiegel von *all-trans*-RA und den Folgemetaboliten *all-trans*-4-hydroxy-RA und *all-trans*-4-oxo-RA signifikant reduziert. Es wäre daher denkbar, daß eine mögliche, synergistische Wirkung von PA oder POH durch die gleichzeitige Verringerung der Konzentration des RAR-Liganden *all-trans*-RA im Embryo kompensiert würde. Nach gleichzeitiger Gabe von POH und RA war die maternale und embryonale Exposition mit *all-trans*-RA und seinen Metaboliten jedoch nicht signifikant unterschiedlich von der Exposition nach alleiniger RA-Gabe.



## 5 - Diskussion

---

Es ist berichtet worden, daß die RXR-abhängige Transkriptionsaktivität von 9-*cis*-RA 200-fach potenter ist als die von Phytansäure (Kitareewan et al. 1996). Nach Gabe von all-*trans*-RA wurde sowohl in maternalem Plasma als auch in embryonalem Gewebe 9-*cis*-RA detektiert. Bei gleichzeitiger Administration von POH oder PA waren die Konzentrationen an 9-*cis*-RA zwar verringert, es konnten aber immer noch beträchtliche Mengen nachgewiesen werden. Die vorhandenen Mengen könnten durchaus ausreichend gewesen sein, um die Ligand-Rezeptor-Bindung zwischen Phytansäure und RXR zu stören. In einem Reporter-gen-Assay war die Konzentration an Phytansäure, die zur Induktion eines RXR-responsiven Promotors nötig war, mehr als 1000-fach höher als die Konzentration an 9-*cis*-RA (LeMotte et al. 1996). Es ist bekannt, daß bei hohen Konzentrationen 9-*cis*-RA die Bildung von RXR-Homodimeren gegenüber der Formierung von RAR-RXR-Heterodimeren bevorzugt wird. Als Konsequenz wäre eine Potenzierung RAR-induzierter Defekte nicht möglich, da der Partner-Rezeptor nicht zur Verfügung steht.

Die  $C_{\max}$ - und AUC-Werte der Metaboliten von all-*trans*-RA lassen vermuten, daß PA und POH einen Einfluß auf den Metabolismus von all-*trans*-RA ausüben. Die Plasmakonzentrationen von all-*trans*-4-oxo-RA waren nach gleichzeitiger Gabe von POH bzw. PA unverhältnismäßig zur Reduzierung der Plasmaspiegel von all-*trans*-RA verringert. Es wäre möglich, daß Phytansäure ein Konkurrenzsubstrat für Cytochrom P450-Enzyme darstellt und dadurch die Bildung von all-*trans*-4-hydroxy-RA und all-*trans*-4-oxo-RA verringert ist. Nach Gabe von RA und POH könnte aufgrund der sehr hohen applizierten Dosen auch aus POH gebildete Phytansäure eine Hemmung des durch P450-Enzyme und Dehydrogenasen vermittelten Metabolismus von all-*trans*-4-hydroxy- zu all-*trans*-4-oxo-RA bewirken.

Die gleichzeitige Gabe von ROH und POH bzw. PA führte im Vergleich zur alleinigen Gabe von ROH zu einem offenkundigen Einfluß auf Absorption, Kinetik und Metabolismus von Retinoiden. In Tabelle 5.3 ist dieser Einfluß durch Berechnung der Reduzierung des  $C_{\max}$ - bzw. AUC-Wertes von Retinoid-Metaboliten durch gleichzeitige POH- bzw. PA-Gabe im Vergleich zur alleinigen ROH-Gabe zusammengefaßt.

## 5 - Diskussion

Die gleichzeitige Gabe von POH führte außerdem zu einem deutlichen Unterschied in der Plasmakinetik von Retinol (s. Abbildung 4.27). Sowohl Plasma- $C_{\max}$  als auch -AUC von Retinol und Retinylestern wurden bei gleichzeitiger POH-Gabe um mehr als 50% reduziert. Nach gleichzeitiger Gabe von ROH und PA waren Plasma- $C_{\max}$  und -AUC von Retinol und Retinylestern lediglich um 6-44 % reduziert. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist nicht auszuschließen, daß POH einen Einfluß auf die Absorption von exogen verabreichtem Retinol nimmt. Eine solche Interaktion erscheint möglich, da gezeigt wurde, daß Phytol überwiegend über die intestinale Lymphe transportiert wird (Baxter et al. 1967). Bei PA ist ein solcher Einfluß nur bedingt zu erkennen. Bisher ist nicht untersucht worden, über welchen Weg oral verabreichte Phytansäure aufgenommen wird.

Das wichtigste Ergebnis dieser Studie war, daß der oxidative Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA sowohl nach POH- als auch nach PA-Gabe verringert war. Nach POH-Gabe konnten in den Plasmaproben nur sehr geringe Konzentrationen der polaren Metaboliten gemessen werden. All-*trans*-RA war sogar nur in einer Probe detektierbar. Nach PA-Gabe waren Plasma- $C_{\max}$ - und AUC-Werte von all-*trans*-RA um 50-65 % verringert.

Substanz	$C_{\max}$		AUC <sub>0-12h</sub>	
	ROH+POH	ROH+PA	ROH+POH	ROH+PA
Retinol	-75 %	-19 %	-57 %	-17 %
Retinylpalmitat/-oleat	-68 %	-44 %	-56 %	-31 %
Retinylstearat	-63 %	-26 %	-54 %	-6 %
Retinyllinoleat	-76 %	-36 %	-55 %	-29 %
All- <i>trans</i> -RA	-100%	-50 %	-99 %	-65 %
All- <i>trans</i> -4-oxo-RA	-100 %	-15 %	-	-
All- <i>trans</i> -RAG	-59 %	-7 %	-	-

Tabelle 5.3: Reduzierung der Plasma- $C_{\max}$ - bzw. Plasma-AUC-Werte in nichtträchtigen Mäusen bei gleichzeitiger Gabe von ROH und POH bzw. PA im Vergleich zur alleinigen ROH-Gabe.

Die nahezu vollständige Blockierung des oxidativen Metabolismus von Retinol zu all-*trans*-RA bei gleichzeitiger Gabe von ROH und POH, könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese Substanzen gemeinsame Stoffwechselwege aufweisen. Dies erscheint möglich, da sowohl Phytol

## 5 - Diskussion

---

als auch Retinol durch mikrosomale Enzyme oxidiert werden (Muralidharan and Muralidharan 1986; Muralidharan and Muralidharan 1985).

Der Einfluß von POH bzw. PA auf Absorption und Metabolismus von Retinol könnte eine Erklärung für die Aufhebung Retinol-induzierter Mißbildungen in der Maus sein. Die 8 h nach Gabe von ROH allein oder mit POH bzw. PA gemessenen Retinoid-Konzentrationen in Plasma und Feten zeigten, daß die Retinoidspiegel in den Feten nach gleichzeitiger POH-Applikation signifikant verringert waren, nach PA-Applikation hingegen nicht. Maximale Retinoidspiegel, die eher einen Vergleich der Exposition erlauben würden, wären zu früheren Zeitpunkten zu erwarten gewesen.

Die hier diskutierten Daten zum Einfluß von POH bzw. PA auf den Metabolismus und die Kinetik von RA bzw. ROH haben gezeigt, daß Interaktionen möglich erscheinen. Phytol und Retinol besitzen gemeinsame Absorptions- und Metabolismuswege. Auch Phytansäure und all-*trans*-RA könnten über die Metabolisierung durch P450-Enzyme überschneidende Stoffwechselwege aufweisen. Die Ergebnisse der Teratogenitäts-Untersuchungen sind damit jedoch nicht vollständig zu beantworten. Insbesondere die Ergebnisse nach Gabe von POH und RA bzw. PA und ROH lassen sich nicht ausschließlich durch pharmakokinetische Aspekte erklären. Einen Beitrag zur vollständigen Aufklärung der Interaktionen in Bezug auf die teratogene Wirkung in der Maus könnte durch Erstellung von Kinetiken in trächtigen Tieren (Messung in maternalem Plasma und embryonalem Gewebe) sowie durch die Bestimmung von Phytol- bzw. Phytansäure-Konzentrationen erreicht werden. Metabolische Interaktionen könnten durch *in vitro*-Versuche unter Verwendung von mikrosomalen oder cytosolischen Fraktionen der Leber oder anderer Organe aufgeklärt werden.

### 5.4.3 Schlußfolgerungen

Die in verschiedenen Systemen beschriebenen, synergistischen Wirkungen von RXR-Liganden auf Effekte, die durch RAR-Liganden und die Bildung von RAR-RXR-Heterodimeren hervorgerufen werden, konnten in der Maus durch Verabreichung natürlicher Liganden für beide Rezeptoren nicht reproduziert werden. Obwohl ein Zusammenspiel zwischen synthetischen RXR- und natürlichen RAR-Liganden (und umgekehrt) bei der Auslösung Rezeptor-vermittelter, teratogener Effekte bewiesen wurde, ist eine solche Interaktion zwischen den natürlichen Liganden *all-trans*-RA und Phytansäure sowie deren Vorläufersubstanzen Retinol und Phytol nicht zu erkennen. Folgende Hypothesen könnten erklären, warum ein Synergismus in Bezug auf die teratogene Wirkung in der Maus nicht auftrat:

1. Einfluß auf Absorption und Verteilung von Retinoiden:  $C_{\max}$ - und AUC-Werte der verabreichten Retinoide waren bei gleichzeitiger Gabe von POH oder PA verringert. Aufgrund der Strukturähnlichkeit und des gemeinsamen lipophilen Charakters könnten PA/POH die intestinale Absorption und Prozessierung von natürlichen Retinoiden beeinflussen.
2. Einfluß auf den Metabolismus von Retinoiden: Wie in Abschnitt 1.11 dargestellt, sind in Bezug auf den Metabolismus dieser Substanzklassen Gemeinsamkeiten möglich. Insbesondere die Ergebnisse bei gleichzeitiger Gabe von ROH und POH lassen vermuten, daß der oxidative Metabolismus von Retinol zu *all-trans*-RA, der wie der Metabolismus von Phytol auch in mikrosomalen Fraktionen nachgewiesen wurde, durch gleichzeitige POH-Gabe gestört wird. Auch die weitere Verstoffwechselung von *all-trans*-RA zu 4-hydroxy- und 4-oxo-Metaboliten durch P450-Enzyme scheint durch PA beeinflussbar. Es ist daher denkbar, daß durch die verringerte Bioverfügbarkeit von *all-trans*-RA nach gleichzeitiger Applikation von POH/PA eine mögliche, synergistische Wirkung kompensiert wird. Synthetische Liganden zeichnen sich neben ihrer hohen Bindungsaffinität auch durch eine geringe Metabolisierung aus. Ein Einfluß von POH/PA auf Metabolismus und Kinetik synthetischer Liganden ist daher nahezu auszuschließen.
3. 9-*cis*-RA als Konkurrenzligand von Phytansäure: Nach Gabe von ROH oder RA allein oder in Kombination mit POH/PA konnte 9-*cis*-RA detektiert werden. Dieser Metabolit bindet in

## 5 - Diskussion

---

einigen Systemen 200-fach potenter an RXR als Phytansäure. Es ist außerdem bekannt, daß bei hohen Konzentrationen an 9-*cis*-RA bevorzugt die Bildung von RXR-Homodimeren erfolgt, so daß in Gegenwart von 9-*cis*-RA die Bildungsrate von RAR-RXR-Heterodimeren verringert sein könnte. Die Bildung von 9-*cis*-RA aus all-*trans*-RA könnte somit zumindestens dazu beigetragen haben, daß keine Potenzierung der Retinoid-induzierten Wirkungen erfolgte.

4. Phytansäure ist ein Ligand für den PPAR $\alpha$  (Wolfrum et al. 1999; Ellinghaus et al. 1999): Phytansäure gilt nicht nur als Ligand für den RXR, sondern auch für den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptor alpha (PPAR $\alpha$ ). Auch der PPAR $\alpha$  kann als Heterodimer-Partner für RXR fungieren. Es wäre daher möglich, daß in Gegenwart selektiver Liganden für die RAR-Subtypen RAR-RXR-Heterodimere gebildet werden, wohingegen in Gegenwart von natürlichen, unselektiven Liganden, wie z.B. all-*trans*-RA, die Bildung von RXR-PPAR-Heterodimeren erfolgt.
5. Plazentarer Transfer natürlicher und synthetischer Liganden: All-*trans*-RA zeigt einen sehr effizienten, plazentaren Transfer. In trächtigen Mäusen wurden an GD 11 nach Gabe einer teratogenen Dosis von 10 mg RA/kg KG embryonale und maternale AUC-Werte verglichen. Es zeigte sich, daß das Verhältnis embryonaler AUC/maternaler AUC nahezu 1 ist (Tzimas et al. 1995). Im Gegensatz dazu wurde nach Gabe einer teratogenen Dosis des synthetischen Retinoids CD394 (10 mg/kg KG, GD 11) an trächtige Mäuse ein Ratio <0,2 ermittelt (Sass et al. 1995). Ein möglicher Einfluß von POH/PA auf die systemische Bioverfügbarkeit von RAR-Liganden könnte sich auf embryonale Konzentrationen von all-*trans*-RA drastischer auswirken als auf embryonale Spiegel synthetischer Liganden.

### 5.5 HPLC gekoppelt mit Diodenarray- und MS-MS-Detektion in der Retinoid-Analytik

Der Vergleich der Signal-Rausch-Verhältnisse zwischen UV-Spur und MS-MS-Spur hat gezeigt, daß die APCI-MS-MS-Detektion eine wesentliche Verbesserung in Bezug auf eine sichere und empfindlichere Identifizierung von Retinoid-Metaboliten darstellt. Durch die Möglichkeit, Ionen selektiv auszuwählen und in einem weiteren Fragmentierungsschritt spezifische Tochterionen zu erzeugen, gelang eine effiziente Unterdrückung der Matrix-Interferenzen. Aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses der MS-MS-Spur nach Chromatographie der RA-Isomere ließ sich eine minimale Nachweisempfindlichkeit von ca. 25-30 pg bestimmen. Damit zeigte die MS-MS-Detektion eine 2- bis 3-fach verbesserte Nachweisempfindlichkeit gegenüber der UV-Detektion. Ein weiterer Vorteil liegt in verbesserten Möglichkeiten zur Identifizierung von Metaboliten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *all-trans*-4-hydroxy-RA als maternaler und embryonaler Metabolit nach Behandlung trächtiger Mäuse mit *all-trans*-RA identifiziert werden. Bisher ist diese Substanz als *in vivo*-Metabolit von *all-trans*-RA nicht bekannt. 13-*cis*-4-hydroxy-RA wurde als *in vivo*-Metabolit von 13-*cis*-RA in Hamstern identifiziert (Frolik 1981; Frolik et al. 1980). Außerdem ist die *in vitro*-Oxidation von *all-trans*-RA zu *all-trans*-4-hydroxy-RA durch P450-Enzyme beschrieben worden (Frolik et al. 1979; Duell et al. 1992).

Bei der verwendeten Chromatographie-Methode koeluierte dieser Metabolit mit 13-*cis*-4-oxo-RA, ein Retinoid, das beim Menschen als Hauptkomponente des oxidativen Metabolismus nach Vitamin-A-Gabe beschrieben ist (Eckhoff und Nau 1990, Buss et al. 1994). Eine Unterscheidung war bisher nur aufgrund des Verhältnisses der Flächen bei zwei Detektionswellenlängen ( $FE_{340nm}/FE_{356nm}$ ) möglich. Das Verhältnis betrug bei *all-trans*-4-hydroxy-RA ca. 1,3 und bei 13-*cis*-4-oxo-RA ca. 0,88. Ein Gemisch aus beiden Komponenten wäre mittels UV-Detektion kaum quantifizierbar. Durch die selektive MS-MS-Detektion gelang es, zwischen diesen Metaboliten zu unterscheiden. Es zeigte sich, daß nach Behandlung trächtiger Mäuse mit RA nur *all-trans*-4-hydroxy-RA und nicht 13-*cis*-4-oxo-RA detektiert werden konnte. Inwieweit dieser Metabolit für eine teratogene Wirkung durch RA-Gabe mitverantwortlich ist, kann bisher nicht beantwortet werden. Jedoch stellt *all-trans*-4-hydroxy-RA das durch P450-Enzyme erzeugte Zwischenprodukt bei der Entstehung von *all-trans*-4-oxo-RA dar.

## *5 - Diskussion*

---

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß es mittels MS-MS-Detektion möglich ist, Retinoide auch in komplexen Matrices selektiver und empfindlicher zu detektieren. Die Verbesserung der Probenvorbereitung in Verbindung mit dieser Detektionsmethode sollte es ermöglichen, endogene Retinoidspiegel sicherer zu bestimmen.





### **6 Zusammenfassung**

Vitamin-A-Alkohol (Retinol) und seine Metaboliten sind essentiell für verschiedene physiologische Prozesse (Sehvorgang, Reproduktion, Wachstum und Differenzierung von Zellen, embryonale Entwicklung). Auf der anderen Seite besteht beim Menschen der Verdacht, daß die Aufnahme hoher Vitamin-A-Mengen während der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für embryonale Mißbildungen verbunden ist. Verschiedene nationale und internationale Organisationen haben Empfehlungen zur Vitamin-A-Supplementierung schwangerer Frauen herausgegeben. Die empfohlene tägliche Aufnahme liegt bei 2.000-3.000 IU Vitamin A, ein erhöhtes Risiko ist auf Basis von epidemiologischen Daten bereits bei einer täglicher Aufnahme von 10.000-25.000 IU zu befürchten (Rosa 1993, Rothman et al. 1995). Nachdem in Großbritannien im Jahre 1990 erhöhte Vitamin-A-Gehalte in Schlacht tierlebern festgestellt wurden, haben auch durch das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin angestrebte Untersuchungen ergeben, daß die Vitamin-A-Gehalte in Schlacht tierlebern deutscher Provenienz deutlich über den in den einschlägigen Nährwerttabellen angegebenen Werten lagen (Anonymus 1995). Eine Lebermahlzeit kann demzufolge mit der Aufnahme der 10- bis 30-fachen Menge des Risikogrenzwertes einhergehen.

Die teratogene Wirkung von Vitamin A, aber auch seine essentiellen Funktionen werden zum größten Teil durch den Metabolismus zu aktiven Retinoiden vermittelt. Retinsäuren, Oxidationsprodukte des Vitamin-A-Alkohols, spielen hierbei eine zentrale Rolle, da sie als an die nukleären Transkriptionsfaktoren RAR und RXR binden und die Expression bestimmter Gene beeinflussen können.

Bisher existierte erst eine Arbeit, die sich mit dem Metabolismus von Vitamin A nach Leberverzehr beschäftigt hat. In der Studie von Buss et al. (1994) wurde der Metabolismus nach Aufnahme von 50 mg oder 150 mg (166.667 IU bzw. 500.000 IU) Vitamin A als Lebermahlzeit oder als Supplement verglichen. Dieser Vergleich ist jedoch fragwürdig, da die Einnahme solcher hoher Vitamin-A-Mengen als Supplement nur bei mißbräuchlicher Anwendung erfolgen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Metabolismus von Vitamin A im Menschen nach Einnahme einer durchschnittlichen Lebermahlzeit (2 g Rohgewicht/kg KG entsprechend einer Aufnahme von ca. 1 mg oder 3.300 IU Vitamin A/kg KG) untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

## 6 - Zusammenfassung

---

- Neben den bereits bekannten Plasma-Metaboliten *all-trans*-4-oxo-Retinsäure (*all-trans*-4-oxo-RA), *13-cis*-4-oxo-RA, *13-cis*- und *all-trans*-RA wurden nach Verzehr einer Lebermahlzeit erstmals im Menschen die Vitamin-A-Metaboliten *9-cis*-RA, *9,13-di-cis*-RA und *14-hydroxy-4,14-retro-retinol* (*14-HRR*) identifiziert.
- Nach Leberverzehr war die maximale Konzentration ( $C_{\max}$ ) von Retinol trotz homöostatisch kontrollierter Plasmaspiegel signifikant höher (1,25-fach) als endogene Konzentrationen. Die gleichzeitige Bestimmung des Plasmabindungsproteins RBP ergab, daß Retinol zu einigen Zeitpunkten (10 h und 24 h nach Leberverzehr) in molarem Überschuß vorlag.
- Die Plasmaspiegel der Retinylester - insbesondere Retinylpalmitat/-oleat - stiegen mehr als 100-fach an und waren auch nach 24 h noch deutlich erhöht.
- *13-cis*-RA und *13-cis*-4-oxo-RA waren die Hauptrepräsentanten des oxidativen Metabolismus von Vitamin A; ihre Plasmaspiegel waren um das 20- bzw. 13-fache erhöht. Im Gegensatz dazu lagen die Plasmakonzentrationen von *all-trans*-RA und *all-trans*-4-oxo-RA über die gesamte Zeitspanne nur geringfügig über endogenen Werten.

Die im Rahmen dieser Studie identifizierten Metaboliten stellen in einigen biologischen Systemen mehr oder weniger aktive Formen von Vitamin A dar. Zur Abschätzung eines Risikos einer erhöhten Vitamin-A-Aufnahme durch Leberverzehr könnten tierexperimentelle Untersuchungen beitragen, da sie die Bestimmung von Retinoiden im Zielgewebe (Embryo) ermöglichen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, daß das Kaninchen dem Menschen in Bezug auf den Metabolismus von hochdosiertem Vitamin A sehr ähnlich ist (Tzimas et al. 1996). Ein Vergleich der *all-trans*-RA-Spiegel im Plasma nach Vitamin-A-Dosierung beim Kaninchen und Leberkonsum beim Menschen offenbarte eine vergleichbare systemische Exposition. Im Kaninchen-Embryo akkumulierte dieser Metabolit im Vergleich zur maternalen Exposition wegen seiner spezifischen Bindung an CRABP. Beim Menschen sind *all-trans*-RA-Spiegel im Embryo nicht bekannt, allerdings sind auch dort die zellulären Bindeproteine hochexprimiert. Es ist daher wahrscheinlich, daß der menschliche Embryo *all-trans*-RA zu kumulieren vermag. Ein Vergleich des Metabolismus von Vitamin A hat gezeigt, daß aktive Vitamin-A-Metaboliten nach Leberverzehr in vergleichbaren oder sogar höheren Mengen gebildet werden als nach chronischer

## 6 - Zusammenfassung

---

Supplementation. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint es daher ratsam, Frauen im gebärfähigen Alter vor dem Verzehr von Leber und Leberprodukten zu warnen. Eine Deckung des täglichen Vitamin-A-Bedarfs wäre durch Verzehr von Obst- und Gemüseprodukten möglich, die das in dieser Hinsicht unbedenkliche Provitamin A ( $\beta$ -Carotin und andere Carotinoide) in ausreichender Menge enthalten. Auf der anderen Seite wurde allerdings darauf hingewiesen, daß Leber in einigen Ländern als preiswerte Quelle für eine Vielzahl von Nährstoffen (u.a. Folate, Vitamin B12, Thiamin) sehr geschätzt wird (Nelson 1990). Diese Quelle adäquat zu ersetzen, ist mit einem hohen Kostenaufwand verbunden, der in bestimmten sozialen Schichten nicht tragbar ist.

In der Humanstudie von Buss et al. (1994) trat bezüglich des Metabolismus von hochdosiertem Vitamin A nach Leberverzehr oder Supplementation ein wesentlicher Unterschied auf. Nach Supplementation waren die Plasmaspiegel des aktiven Metaboliten *all-trans*-RA gemessen am AUC-Wert und an der maximalen Konzentration ca. 8- bzw. 20-fach höher als die entsprechenden Werte nach Leberverzehr, obwohl die Bioverfügbarkeit von Vitamin A nahezu vergleichbar war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob aufgrund einer nach Supplementation auftretenden Übersättigung physiologischer Absorptions-, Metabolismus- und Transportwege ein oxidativer Metabolismus von Vitamin A zu *all-trans*-RA bereits im Intestinaltrakt stattfinden kann. Zunächst konnte ein oxidativer Metabolismus *in vitro* durch Inkubation cytosolischer Fraktionen der Dünndarmmukosa vom Schwein nachgewiesen werden. Es wurden  $K_M$ -Werte von ca. 95  $\mu$ M und  $v_{max}$ -Werte von 7,9-8,6 pmol/min/mg Protein bestimmt. Die Verwendung verschiedener Lösungsvermittler im Inkubationsansatz (DMSO oder das Konkurrenzsubstrat Ethanol) ließen vermuten, daß mindestens zwei unterschiedliche Enzymsysteme an diesem Metabolismus beteiligt sind, wobei ein System Retinol bereits bei niedrigen Substratkonzentrationen umsetzt, wohingegen das andere System (vermutlich eine Ethanol-abhängige Dehydrogenase) erst bei hohen Retinol-Konzentrationen aktiv ist. Ein intestinaler Metabolismus konnte auch durch ein *in vivo*-Experiment am Schwein bewiesen werden. Dazu wurde einem Schwein die Portalvene und die Vena jugularis externa (= Zentralvene) kanüliert. Nach Gabe von Vitamin A als Supplement oder Leber wurden die Plasmaspiegel der Vitamin-A-Metaboliten in Portalvene und Zentralvene verglichen. Es zeigte

## 6 - Zusammenfassung

---

sich, daß nur nach Supplementation einer hohen Vitamin-A-Dosis, nicht aber nach Gabe einer adäquaten Menge in Form von Leber, die all-*trans*-RA-Spiegel im Plasma der Portalvene deutlich höher waren als im Plasma der Zentralvene. Dieser Unterschied fiel jedoch nicht so deutlich wie erwartet aus, weil der Großteil des überschüssigen Retinols nach Supplementation im Intestinaltrakt durch Phase-II-Metabolismus zu Retinyl- $\beta$ -D-Glukuronid (ROG) umgewandelt wurde. Die Bildung von ROG ist beim Menschen bisher nicht beschrieben. Es ist daher anzunehmen, daß der in der Studie von Buss et al. (1994) beschriebene Unterschied in der Kinetik von all-*trans*-RA nach Supplementation bzw. Leberverzehr seine Begründung in einem bereits im Intestinaltrakt stattfindenden, oxidativen Metabolismus von Vitamin A aus Supplementen findet. Da die Bioaktivierung von Retinol zu all-*trans*-RA auch für die teratogene Wirkung von Retinoiden verantwortlich gemacht wird, könnte eine für Supplementationen zu ermittelnde Schwellendosis, bei der ein oxidativer Metabolismus im Intestinaltrakt gerade noch festgestellt werden kann, gleichbedeutend mit der Dosis sein, durch die das Risiko teratogener Effekte erhöht ist.

Phytansäure, ein Metabolit des Chlorophyll-Bestandteils Phytol, der in hohen Mengen im Fettgewebe von Wiederkäuern vorkommt, wurde als Ligand für den Retinoid X Rezeptor (RXR) beschrieben. Da teratogene Wirkungen von Retinoiden größtenteils auf eine Rezeptor-vermittelte Beeinflussung der Expression bestimmter Gene zurückzuführen sind, wurde vermutet, daß auch Phytansäure sowie deren Vorläufersubstanz Phytol Einfluß auf solche Prozesse nehmen könnten. Bei Patienten mit bestimmten, angeborenen Stoffwechselstörungen (Refsum-Krankheit, Zellweger-Syndrom), die zu einer Akkumulation von Phytansäure führten, wurden Krankheits-Symptome festgestellt, die mit den nach Vitamin-A-Defizienz oder -Überschuß auftretenden Krankheitsbildern (Retinitis pigmentosa, Ichthyose) gut übereinstimmten (Stuttgen 1986; Kaufman 1998, van Soest et al. 1999). Untersuchungen zur teratogenen Wirkung von synthetischen Rezeptorliganden in Mäusen ergaben, daß die teratogenen Effekte synthetischer RAR-Liganden (CD437, Am580) durch gleichzeitige Gabe von synthetischen RXR-Liganden (LG1069, AGN191701) potenziert werden konnten, obwohl die alleinige Gabe des RXR-Liganden keinerlei Effekte hervorrief (Elmazar et al. 1997). Die gleichzeitige Verabreichung eines synthetischen RAR-Liganden und Phytansäure führte zu ähnlichen Ergebnissen (Elmazar

## 6 - Zusammenfassung

---

und Nau 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Verabreichung des natürlichen Liganden *all-trans*-RA (RAR) bzw. der Vorläufersubstanz Retinol zusammen mit Phytansäure (RXR) bzw. der Vorläufersubstanz Phytol an trächtige Mäuse ebenfalls potenzierend auf RAR-vermittelte, teratogene Effekte wirkt. Die gleichzeitige Gabe von *all-trans*-RA und Phytansäure bzw. Phytol führte zu keinem synergistischen Effekt auf durch *all-trans*-RA induzierte Mißbildungen. Untersuchungen zur Plasmakinetik und zur embryonalen und maternalen Exposition ergaben, daß Phytansäure zwar einen sichtbaren, aber nicht signifikanten Einfluß auf die Plasmakinetik von *all-trans*-RA ausübt. Weiterhin schien der Metabolismus von *all-trans*-RA zu polareren Metaboliten beeinflußt zu werden. Nach gleichzeitiger Gabe von Retinol und Phytansäure/Phytol fand statt einer Potenzierung eine komplette Aufhebung Retinol-induzierter, teratogener Effekte statt, die zum Teil durch eine Störung der Absorption und des oxidativen Metabolismus von Retinol begründet werden kann. Dennoch bleibt festzustellen, daß Interaktionen von Phytol bzw. Phytansäure mit der Absorption und dem Metabolismus von Retinoiden nicht ausschließlich als Gründe für diese Ergebnisse herangezogen werden können. Synergistische Effekte bezüglich der teratogenen Wirkung dieser natürlichen Lebensmittelbestandteile konnten in tierexperimentellen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Im Hinblick auf die genannten Stoffwechselerkrankungen, die mit einer Akkumulation von Phytansäure einhergehen, wäre es wichtig, mögliche Interaktionen dieser Komponenten in Bezug auf ihren Metabolismus aufzuklären. Hierzu könnten *in vitro*-Experimente beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensitivität der analytischen Bestimmung von Retinoiden mittels HPLC gekoppelt mit MS- bzw. MS-MS-Detektion getestet. Es zeigte sich, daß die Bestimmung von RA-Isomeren mittels MS-MS-Detektion ca. 3-fach empfindlicher ist als die Bestimmung mittels UV-Detektion bei 340 nm. *All-trans*-4-hydroxy-RA wurde als maternaler und embryonaler Metabolit in Mäusen nach Behandlung mit *all-trans*-RA identifiziert.



### **7 Literaturverzeichnis**

Anonymous (1994). *Vitamin A and teratogenicity*, Health Council and Food and Nutrition Council, The Hague.

Anonymous (1995). *Zum Vitamin-A-Gehalt in Schlachttierlebern*, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin.

Abu AS, Beckett BR, Chiba H, Chithalen JV, Jones G, Metzger D, Chambon P und Petkovich M (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J.Biol.Chem.* **273**: 2409-2415.

Allali HA, Peralba JM, Martras S, Farres J und Pares X (1998). Retinoids, omega-hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates und H2-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **426**: 362-366.

Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P und et a (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90** : 30-34.

Ang HL, Deltour L, Zgombic KM, Wagner MA und Duester G (1996). Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **20**: 1050-1064.

Arens JF und van Dorp DA (1946). Synthesis of some compounds possessing vitamin A activity. *Nature* **157**: 190-191.

Armstrong RB, Ashenfelter KO, Eckhoff C, Levin AA und Shapiro SS (1994). General and reproductive toxicology of retinoids. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 545-572. Raven Press, New York.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Arnhold T, Tzimas G, Wittfoht W, Plonait S und Nau H (1996). Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9,13-di-*cis*-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sci.* **59**: L169-L177

Avigan J (1966). The presence of phytanic acid in normal human and animal plasma. *Biochim.Biophys.Acta* **116**: 391-394.

Bailey JS und Siu CH (1988). Purification and partial characterization of a novel binding protein for retinoic acid from neonatal rat. *J.Biol.Chem.* **263**: 9326-9332.

Ball MD, Furr HC und Olson JA (1986). Acyl coenzyme A:retinol acyltransferase activity and the vitamin A content of polar bear (*Ursus maritimus*) liver. *Comp.Biochem.Physiol.B* **84**: 513-517.

Bangham AD, Dingle JT und Lucy JA (1964). Studies on the mode of action of excess vitamin A. *Biochem.J.* **90**: 133-140.

Barua AB, Batres RO und Olson JA (1988). Synthesis and metabolism of all-*trans*-[11-3H]retinyl beta-glucuronide in rats in vivo. *Biochem.J.* **252**: 415-420.

Barua AB, Batres RO und Olson JA (1989). Characterization of retinyl beta-glucuronide in human blood. *Am.J.Clin.Nutr.* **50**: 370-374.

Barua AB, Gunning DB und Olson JA (1991). Metabolism in vivo of all-*trans*-[11-3H]retinoic acid after an oral dose in rats. Characterization of retinoyl beta-glucuronide in the blood and other tissues. *Biochem.J.* **277**: 527-531.

Barua AB und Olson JA (1986). Retinoyl beta-glucuronide: an endogenous compound of human blood. *Am.J.Clin. Nutr.* **43**: 481-485.

Barua AB und Olson JA (1987). Chemical synthesis and growth-promoting activity of all-*trans*-retinyl beta-D-glucuronide. *Biochem.J.* **244**: 231-234.



## 7 - Literaturverzeichnis

---

Bavik C, Ward SJ und Chambon P (1996). Developmental abnormalities in cultured mouse embryos deprived of retinoic acid by inhibition of yolk-sac retinol binding protein synthesis. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* **93**: 3110-3114.

Baxter JHD, Steinberg D, Mize CE und Avigan J (1967). Absorption and metabolism of uniformly <sup>14</sup>labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. *Biochim. Biophys. Acta* **137**: 277-290.

Berr F und Kern F (1984). Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. *J.Lipid Res.* **25**: 805-812.

Bhat PV, Poissant L, Falardeau P und Lacroix A (1988). Enzymatic oxidation of all-*trans* retinal to retinoic acid in rat tissues. *Biochem.Cell Biol.* **66**: 735-740.

Bhat PV, Poissant L und Lacroix A (1988). Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim.Biophys.Acta* **967**: 211-217.

Bhat PV und Samaha H (1999). Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem.Pharmacol.* **57**: 195-197.

Bieri JG und McKenna MC (1981). Expressing dietary values for fat-soluble vitamins: changes in concepts and terminology. *Am.J.Clin.Nutr.* **34**: 289-295.

Blaner WS (1989). Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr.Rev.* **10**: 308-316.

Blaner WS, Galdieri M und Goodman DS (1987). Distribution and levels of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein in various types of rat testis cells. *Biol.Reprod.* **36**: 130-137.

Blaner WS, Hussain MM, Talmage DA, Wong Yen Kong L, Piantedosi R, Mahley RW und Goodman DS (1991). Retinoids are actively metabolized in rabbit bone marrow. *FASEB J.* **5**: A717

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Blaner WS und Olson JA (1994). Retinol and retinoic acid metabolism. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine* (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 229-256. Raven Press, New York.

Blomhoff R (1994). Introduction: Overview of vitamin A metabolism and function. In: *Vitamin A in health and disease* (Blomhoff, R., ed.), pp. 1-35. Marcel Dekker, New York.

Blomhoff R, Eskild W, Kindberg GM, Prydz K und Berg T (1985). Intracellular transport of endocytosed chylomicron [3H]retinyl ester in rat liver parenchymal cells. Evidence for translocation of a [3H]retinoid from endosomes to endoplasmatic reticulum. *J.Biol.Chem.* **260**: 13566-13570.

Blomhoff R, Green MH und Norum KR (1992). Vitamin A: Physiological and biochemical processing. *Annu.Rev.Nutr.* **12**: 37-57.

Blomhoff R, Green MH und Norum KR (1992). Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu.Rev.Nutr.* **12**: 37-57.

Blomhoff R, Norum KR und Berg T (1985). Hepatic uptake of [3H]retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. *J.Biol.Chem.* **260**: 13571-13575.

Boerman MH und Napoli JL (1991). Cholate-independent retinyl ester hydrolysis. Stimulation by Apo-cellular retinol-binding protein. *J.Biol.Chem.* **266**: 22273-22278.

Boerman MH und Napoli JL (1995). Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: a short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP (type I). *Biochemistry* **34**: 7027-7037.

Boleda MD, Saubi N, Farres J und Pares X (1993). Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch.Biochem.Biophys.* **307**: 85-90.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Bollag W und Holdener EE (1992). Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann.Oncol.* **3**: 513-526.
- Bolton S (1984). *Pharmaceutical Statistics.*, Marcel Dekker, New York.
- Bosner MS, Gulick T, Riley DJS, Spilburg CA und Lange LG (1988). III. Receptor-like function of heparin in the binding and uptake of neutral lipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**: 7348-7442.
- Bosner MS, Gulick T, Riley DJS, Spilburg CA und Lange LG (1989). Heparin-modulated binding of pancreatic lipase and uptake of hydrolyzed triglycerides in the intestine. *J.Biol.Chem.* **264**: 20261-20264.
- Brazell RK, Vane FM, Ehmann CW und Colburn WA (1983). Pharmacokinetics of isotretinoin during repetitive dosing to patients. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **24**: 695-702.
- Brinkmann E, Dehne L, Oei HB, Tiebach R und Baltes W (1995). Separation of geometrical retinol isomers in food samples by using narrow-bore high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A* **693**: 271-279.
- Brinkmann E, Mehltitz I, Oei HB, Tiebach R und Baltes W (1994). Determination of vitamin A in liver and liver-containing products using narrow-bore normal phase HPLC. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **199**: 206-209.
- Buchan P, Eckhoff C, Caron D, Nau H, Shroot B und Schaefer H. Repeated topical administration of all-trans-retinoic acid and plasma levels of retinoic acids in humans (1994). *J.Am.Acad.Dermatol.* **30**: 428-434.
- Buck J, Derguini F, Levi E, Nakanishi K und Hammerling U (1991). Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-retro-retinol. *Science* **254**: 1654-1656.
- Buck J, Grun F, Derguini F, Chen Y, Kimura S, Noy N und Hammerling U (1993). Anhydroretinol: a naturally occurring inhibitor of lymphocyte physiology. *J.Exp.Med.* **178**: 675-680.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Buss NE, Tembe EA, Prendergast BD, Renwick AG und George CF (1994). The teratogenic metabolites of vitamin A in women following supplements and liver. *Hum.Exp.Toxicol.* **13**: 33-43.
- Carpenter TO, Pettifor JM, Russell RM, Pitha J, Mobarhan S, Ossip MS, Wainer S und Anast CS (1987). Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake. *J.Pediatr.* **111**: 507-512.
- Chai X, Zhai Y, Popescu G und Napoli JL (1995). Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. Expression of its mRNA relative to type I. *J.Biol.Chem.* **270**: 28408-28412.
- Chambon P (1993). The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene* **135**: 223-228.
- Chen C, Mistry G, Jensen B, Heizmann P, Timm U, van-Brummelen P und Rakhit AK (1996). Pharmacokinetics of retinoids in women after meal consumption or vitamin A supplementation. *J.Clin Pharmacol.* **36**: 799-808.
- Chen H und Juchau MR (1998a). Biotransformation of 13-*cis*- and 9-*cis*-retinoic acid to all-*trans*-retinoic acid in rat conceptal homogenates. Evidence for catalysis by a conceptual isomerase. *Drug Metab.Dispos.* **26**: 222-228.
- Chen H und Juchau MR (1998b). Recombinant human glutathione S-transferases catalyse enzymic isomerization of 13-*cis*-retinoic acid to all-*trans*-retinoic acid in vitro. *Biochem.J.* **336**: 223-226.
- Chytil F (1984). Retinoic acid: biochemistry, pharmacology, toxicology und therapeutic use. *Pharmacol.Rev.* **36**: 93S-100S.
- Cohlan SQ (1953). Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* **117**: 535-536.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Colburn WA, Vane FM, Bugge CJL, Carter DE, Bressler R und Ehmann CW (1985). Pharmacokinetics of  $^{14}\text{C}$ -isotretinoin in healthy volunteers and volunteers with biliary T-tube drainage. *Drug Metab.Dispos.* **13**: 327-333.

Colburn WA, Vane FM und Shorter HJ (1983). Pharmacokinetics of isotretinoin and its major blood metabolite following a single dose oral dose to man. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **24**: 689-694.

Collins MD, Eckhoff C, Chahoud I, Bochert G und Nau H (1992). 4-Methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-*trans*-retinoic acid in the mouse. *Arch.Toxicol.* **66**: 652-659.

Collins MD, Eckhoff C, Slikker W, Bailey JR und Nau H (1992). Quantitative plasma disposition of retinol and retinyl esters after high-dose oral vitamin A administration in the cynomolgus monkey. *Fundam.Appl.Toxicol.* **19**: 109-116.

Collins MD, Tzimas G, Hummler H, Burgin H und Nau H (1994). Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-*trans*-retinoic acid, 13-*cis*-retinoic acid, and retinyl palmitate following daily administrations in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **127**: 132-144.

Connor MJ und Smit MH (1987). The formation of all-*trans*-retinoic acid from all-*trans*-retinol in hairless mouse skin. *Biochem.Pharmacol.* **36**: 919-924.

Costa A, Formelli F, Chiesa F, Decensi A, De-Palo G und Veronesi U (1994). Prospects of chemoprevention of human cancers with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res.* **54**: 2032S-2037S.

Creech KJ, Eckhoff C, Kochhar DM, Bochert G, Chahoud I und Nau H (1991). Isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid) metabolism, *cis-trans* isomerization, glucuronidation und transfer to the mouse embryo: consequences for teratogenicity. *Teratog.Carcinog.Mutagen.* **11**: 21-30.

Creech KJ, Lofberg B, Chahoud I, Bochert G und Nau H (1989). Teratogenicity and placental transfer of all-*trans*-, 13-*cis*-, 4-oxo-all-*trans*-, and 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **100**: 162-176.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Crow JA und Ong DE (1985). Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**: 4707-4711.

Cullum ME und Zile MH (1985). Metabolism of all-*trans*-retinoic acid and all-*trans*-retinyl acetate. Demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J.Biol.Chem.* **260**: 10590-10596.

David JSK und Ganguly J (1966). Further studies on the mechanism of absorption of vitamin A and cholesterol. *Indian J.Biochem.* **4**: 14-17.

Dennert G, Crowley C, Kouba J und Lotan R (1979). Retinoic acid stimulation of the induction of mouse killer T-cells in allogeneic and syngeneic systems. *J.Natl.Cancer Inst.* **62**: 89-94.

Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morriss KG und Chambon P (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**: 1133-1151.

Dowling JE und Wald G (1960). The biological function of vitamin A acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **46**: 587-608.

Duell EA, Astrom A, Griffiths CE, Chambon P und Voorhees JJ (1992). Human skin levels of retinoic acid and cytochrome P-450-derived 4-hydroxyretinoic acid after topical application of retinoic acid in vivo compared to concentrations required to stimulate retinoic acid receptor-mediated transcription in vitro. *J.Clin.Invest.* **90**: 1269-1274.

Duell EA, Derguini F, Kang S, Elder JT und Voorhees JJ (1996). Extraction of human epidermis treated with retinol yields retro-retinoids in addition to free retinol and retinyl esters. *J.Invest.Dermatol.* **107**: 178-182.

Duester G (1996). Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**: 12221-12227.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Dunagin PEJ, Zachman RD und Olson JA (1966). The identification of metabolites of retinal and retinoic acid in rat bile. *Biochim.Biophys.Acta* **124**: 71-85.

Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M und Chambon P (1992). All-*trans* and 9-*cis* retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* **71**: 73-85.

Durstun AJ, Timmermans JP, Hage WJ, Hendriks HF, de Vries NJ, Heideveld M und Nieuwkoop PD (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**: 140-144.

Ebner T und Burchell B (1993). Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family. *Drug Metab.Dispos.* **21**: 50-55.

Eckhoff C, Bailey JR, Collins MD, Slikker W und Nau H (1991). Influence of dose and pharmaceutical formulation of vitamin A on plasma levels of retinyl esters and retinol and metabolic generation of retinoic acid compounds and beta-glucuronides in the cynomolgus monkey. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **111**: 116-127.

Eckhoff C, Chari S, Kromka M, Staudner H, Juhasz L, Rudiger H und Agnish N (1994). Teratogenicity and transplacental pharmacokinetics of 13-*cis*-retinoic acid in rabbits. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **125**: 34-41.

Eckhoff C, Collins MD und Nau H (1991). Human plasma all-*trans*-, 13-*cis*- and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid profiles during subchronic vitamin A supplementation: comparison to retinol and retinyl ester plasma levels. *J.Nutr.* **121**: 1016-1025.

Eckhoff C, Lofberg B, Chahoud I, Bochert G und Nau H (1989). Transplacental pharmacokinetics and teratogenicity of a single dose of retinol (vitamin A) during organogenesis in the mouse. *Toxicol.Lett.* **48**: 171-184.

Eckhoff C und Nau H (1990). Identification and quantitation of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid in human plasma. *J.Lipid Res.* **31**: 1445-1454.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Eckhoff C und Nau H (1990). Vitamin A supplementation increases levels of retinoic acid compounds in human plasma: possible implications for teratogenesis. *Arch.Toxicol.* **64** : 502-503.

Eckhoff C, Wittfoht W, Nau H und Slikker W (1990). Characterization of oxidized and glucuronidated metabolites of retinol in monkey plasma by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed.EnvIRON.Mass.Spectrom.* **19**: 428-433.

El Akawi Z und Napoli JL (1994). Rat liver cytosolic retinal dehydrogenase: comparison of 13-*cis*-, 9-*cis*-, and all-*trans*-retinal as substrates and effects of cellular retinoid-binding proteins and retinoic acid on activity. *Biochemistry* **33**: 1938-1943.

Elder JT, Astrom A, Pettersson U, Tavakkol A, Krust A, Kastner P, Chambon P und Voorhees JJ (1992). Retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J.Invest.Dermatol.* **98**: 36S-41S.

Ellinghaus P, Wolfrum C, Assmann G, Spener F und Seedorf U (1999). Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice. *J.Biol.Chem* **274**: 2766-2772.

Ellis CN, Weiss JS, Hamilton TA, Headington JT, Zelickson AS und Voorhees JJ (1990). Sustained improvement with prolonged topical tretinoin (retinoic acid) for photoaged skin. *J.Am.Acad.Dermatol.* **23**: 629-637.

Elmazar MM, Reichert U, Shroot B und Nau H (1996). Pattern of retinoid-induced teratogenic effects: possible relationship with relative selectivity for nuclear retinoid receptors RAR alpha, RAR beta, and RAR gamma. *Teratology* **53**: 158-167.

Elmazar MM, Rühl R, Reichert U, Shroot B und Nau H (1997). RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **146**: 21-28.



## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Elmazar MMA. und Nau H (1998). Synergistic teratogenic effects induced by combinations of synthetic and natural retinoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **358**: R772 (abstract).
- Emerick RJ, Zile M und DeLuca HF (1967). Formation of retinoic acid from retinol in the rat. *Biochem.J.* **102**: 606-611.
- English N, Palmer CN, Alworth WL, Kang L, Hughes V und Wolf CR (1997). Fatty acid signals in *Bacillus megaterium* are attenuated by cytochrome P-450-mediated hydroxylation. *Biochem.J.* **327**: 363-368.
- Epler KS, Ziegler RG und Craft NE (1993). Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. *J.Chromatogr.* **619**: 37-48.
- Eriksson U, Hansson E, Nordlinder H, Busch C, Sundelin J und Peterson PA (1987). Quantitation and tissue localization of the cellular retinoic acid-binding protein. *J.Cell Physiol.* **133**: 482-490.
- Erlanson C und Borgstroem B (1968). The identity of vitamin A esterase activity of rat pancreatic juice. *Biochim.Biophys.Acta* **151**: 629-631.
- Eskild W und Hansson V (1994). Vitamin A functions in the reproductive organs. In: *Vitamin A in health and disease* (Blomhoff, R., ed.), pp. 531-559. Marcel Dekker, New York.
- Fell HB und Mellanby E (1953). Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *J.Physiol.* **119**: 470-488.
- Fex G und Johannesson G (1988). Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **944**: 249-255.
- Fidge NH, Shiratori T, Ganguly J und Goodman DS (1968). Pathways of absorption of retinal and retinoic acid in the rat. *J.Lipid Res.* **9**: 103-109.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Fiorella PD, Giguere V und Napoli JL (1993). Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J.Biol.Chem.* **268**: 21545-21552.

Fiorella PD und Napoli JL (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J.Biol.Chem.* **266**: 16572-16579.

Frolik CA (1981). In vitro and in vivo metabolism of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid in the hamster. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **359**: 37-44.

Frolik CA, Dart LL und Sporn MB (1981). Metabolism of all-*trans*-retinyl acetate to retinoic acid in hamster tracheal organ culture. *Biochim.Biophys.Acta* **663**: 329-335.

Frolik CA, Roberts AB, Tavela TE, Roller PP, Newton DL und Sporn MB (1979). Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid. In vitro metabolites of all-*trans*-retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry* **18**: 2092-2097.

Frolik CA, Roller PP, Roberts AB und Sporn MB (1980). In vitro and in vivo metabolism of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid in hamsters. Identification of 13-*cis*-4-oxoretinoic acid. *J.Biol.Chem.* **255**: 8057-8062.

Furr HC, Barua AB und Olson JA (1994). Analytical Methods. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*. (Sporn, M., Roberts, A. & Goodman, D., eds.), pp. 179-209. Raven Press, New York.

Gamble MV, Shang E, Paintedosi R, Mertz JR, Wolgemuth DJ und Blaner WS (1999). 9-*cis*-retinol dehydrogenase: biochemical properties, tissue expression and gene structure. (*submitted*)

Garbe A, Buck J und Hammerling U (1992). Retinoids are important cofactors in T cell activation. *J.Exp.Med.* **176**: 109-117.

Geelen JA (1979). Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *Crit.Rev.Toxicol.* **6**: 351-375.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Geubel AP, De-Galocsy C, Alves N, Rahier J und Dive C (1991). Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* **100**: 1701-1709.

Giguere V (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr.Rev.* **15**: 61-79.

Giguere V, Lyn S, Yip P, Siu CH und Amin S (1990). Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**: 6233-6237.

Goldstein JL und Brown MS (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.

Goodman DS und Blaner WS (1984). Biosynthesis, absorption and hepatic metabolism of retinol. In: *The Retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 1-39. Academic Press, San Diego.

Gough WH, VanOoteghem S, Sint T und Kedishvili NY (1998). cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase that oxidizes all-*trans*-retinol and 3 $\alpha$ -hydroxysteroids. *J.Biol.Chem.* **273**: 19778-19785.

Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR und Blomhoff R (1993). Vitamin A metabolism in rat liver: a kinetic model. *Am.J.Physiol.* **264**: G509-G521

Green PHR und Glickman RM (1981). Intestinal lipoprotein metabolism. *J.Lipid Res.* **22**: 1153-1173.

Guilbert HR und Hinshaw WR (1934). Vitamin A storage in the livers of turkeys and chickens. *J.Nutrition* **8**: 45-56.

Hale F (1933). Pigs born without eye balls. *J.Hered.* **24**: 105-106.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Harmon MA, Boehm MF, Heyman RA und Mangelsdorf DJ (1995). Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 6157-6160.

Harrison EH und Gad MZ (1989). Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver. Differentiation of bile salt-dependent and bile salt-independent, neutral retinyl ester hydrolases in rat liver. *J.Biol.Chem.* **264**: 17142-17147.

Haselbeck RJ, Ang HL, Deltour L und Duester G (1997). Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology* **138**: 3035-3041.

Hathcock JN, Hattan DG, Jenkins MY, McDonald JT, Sundaresan PR und Wilkening VL (1990). Evaluation of vitamin A toxicity. *Am.J.Clin.Nutr.* **52**: 183-202.

Hebuterne X, Wang XD, Johnson EJ, Krinsky NI und Russell RM (1995). Intestinal absorption and metabolism of 9-*cis*-beta-carotene in vivo: biosynthesis of 9-*cis*-retinoic acid. *J.Lipid Res.* **36**: 1264-1273.

Hebuterne X, Wang XD, Smith DE, Tang G und Russell RM (1996). In vivo biosynthesis of retinoic acid from beta-carotene involves an excentric cleavage pathway in ferret intestine. *J.Lipid Res.* **37**: 482-492.

Heller J (1975). Interactions of plasma retinol-binding protein with its receptor. Specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J.Biol.Chem.* **250**: 3613-3619.

Hendrickx AG und Hummler H (1992). Teratogenicity of all-*trans* retinoic acid during early embryonic development in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Teratology* **45**: 65-74.

Herr FM, Wardlaw SA, Kakkad B, Albrecht A, Quick TC und Ong DE (1993). Intestinal vitamin A metabolism: coordinate distribution of enzymes and CRBP(II). *J.Lipid Res.* **34**: 1545-1554.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM und Thaller C (1992). 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**: 397-406.

Hollander D (1980). Retinol lymphatic and portal transport: influence of pH, bile und fatty acids. *Am.J.Physiol.* **239**: G210-G214

Hollander D und Dadufalza V (1990). Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp.Gerontol.* **25**: 61-65.

Hollander D und Muralidhara KS (1977). Vitamin A1 intestinal absorption in vivo: influence of luminal factors on transport. *Am.J.Physiol.* **232**: E471-E477

Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R und Peters LJ (1990). Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N.Engl.J.Med.* **323** : 795-801.

Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Koszewski NJ und Napoli JL (1995a). 9,13-Di-*cis*-retinoic acid is the major circulating geometric isomer of retinoic acid in the periparturient period. *Arch.Biochem.Biophys.* **322**: 235-239.

Horst RL, Reinhardt TA, Goff JP, Nonnecke BJ, Gambhir VK, Fiorella PD und Napoli JL (1995b). Identification of 9-*cis*,13-*cis*-retinoic acid as a major circulating retinoid in plasma. *Biochemistry* **34**: 1203-1209.

Huang HS und Goodman DS (1965). Vitamin A and Carotenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of <sup>14</sup>C-labeled vitamin A alcohol and β-carotene in the rat. *J.Biol.Chem.* **240**: 2839-2844.

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ und Wang ZY (1988). Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **72**: 567-572.

Hummeler H, Hendrickx AG und Nau H (1994). Maternal toxicokinetics, metabolism, and embryo exposure following a teratogenic dosing regimen with 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) in the cynomolgus monkey. *Teratology* **50**: 184-193.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Hummeler H, Korte R und Hendrickx AG (1990). Induction of malformations in the cynomolgus monkey with 13-*cis* retinoic acid. *Teratology* **42**: 263-272.

Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ und Lindquist PA (1989). Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. *J.Biol.Chem.* **264**: 9571-9582.

Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ und Innerarity TL (1989). Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J.Biol.Chem.* **264**: 17931-17938.

Huter O, Wolf HJ, Schnetzer A und Pfaller K. Lipoprotein lipase, LDL receptors and apolipoproteins in human fetal membranes at term (1997). *Placenta* **18**: 707-715.

Imai S, Okuno M, Moriwaki H, Muto Y, Murakami K, Shudo K, Suzuki Y und Kojima S (1997). 9,13-di-*cis*-Retinoic acid induces the production of tPA and activation of latent TGF-beta via RAR alpha in a human liver stellate cell line, LI90. *FEBS Lett.* **411**: 102-106.

Isler O, Huber W, Ronco A und Kofler M (1947). Synthese des Vitamin A. *Helv.Chim.Acta* **30**: 1911-1927.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1982). Nomenclature of retinoids. Recommendations 1981. *Eur.J.Biochem.* **129**: 1-5.

Jansen GA, Mihalik SJ, Watkins PA, Moser HW, Jakobs C, Denis S und Wanders RJ (1996). Phytanoyl-CoA hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid alpha-oxidation in humans. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **229**: 205-210.

Kakkad BP und Ong DE (1988). Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J.Biol.Chem.* **263**: 12916-12919.

Kang S, Duell EA, Fisher GJ, Datta SC, Wang ZQ, Reddy AP, Tavakkol A, Yi JY, Griffiths CE und Elder JT (1995). Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia

## 7 - Literaturverzeichnis

---

and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation. *J.Invest.Dermatol.* **105**: 549-556.

Karrer P, Helfenstein A, Wehrli H und Wettstein D (1930). Pflanzenfarbstoffe XXV. Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv.Chim.Acta* **13**: 1084-1099.

Karrer P, Morf R und Schoepp K (1931). Zur Kenntnis des Vitamin A aus Fischtranen II. *Helv.Chim.Acta* **14**: 1431-1436.

Karrer P und Eugster CH (1950). Synthese von Carotinoiden II. Totalsynthese des  $\beta$ -Carotin I. *Helv.Chim.Acta* **33**: 1172-1174.

Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dolle P und Chambon P (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**: 987-1003.

Kato M, Sung WK, Kato K und Goodman DS (1985). Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinol-binding protein in rat testis and epididymis. *Biol.Reprod.* **32**: 173-189.

Kaufman LM (1998). A syndrome of retinitis pigmentosa, congenital ichthyosis, hypergonadotropic hypogonadism, small stature, mental retardation, cranial dysmorphism, and abnormal electroencephalogram. *Ophthalmic.Genet.* **19**: 69-79.

Kedishvili NY, Gough WH, Davis WI, Parsons S, Li TK und Bosron WF (1998). Effect of cellular retinol-binding protein on retinol oxidation by human class IV retinol/alcohol dehydrogenase and inhibition by ethanol. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **249**: 191-196.

Kessler J, Arrigo Y, Guidon D, Egger I, Frigg M und Rettenmaier R-M (1992). Vitamin-A-Gehalt von Schweine- und Kalbslebern in Abhängigkeit von der Fütterung. *Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg.* **83**: 30-32.

Kim CI, Leo MA und Lieber CS (1992). Retinol forms retinoic acid via retinal. *Arch.Biochem.Biophys.* **294**: 388-393.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Kistler A (1981). Teratogenesis of retinoic acid in rats: susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology* **23**: 25-31.
- Kitareewan S, Burka LT, Tomer KB, Parker CE, Deterding LJ, Stevens RD, Forman BM, Mais DE, Heyman RA, McMorris T und Weinberger C (1996). Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol.Biol.Cell* **7**: 1153-1166.
- Kizaki M, Ikeda Y, Tanosaki R, Nakajima H, Morikawa M, Sakashita A und Koeffler HP (1993). Effects of novel retinoic acid compound, 9-*cis*-retinoic acid, on proliferation, differentiation und expression of retinoic acid receptor-alpha and retinoid X receptor-alpha RNA by HL-60 cells. *Blood* **82**: 3592-3599.
- Klaus M (1990). Structure characteristics of natural and synthetic retinoids. *Methods Enzymol.* **189**: 3-14.
- Kligman AM, Fulton JE und Plewig G (1969). Topical vitamin A acid in acne vulgaris. *Arch.Dermatol.* **99**: 469-476.
- Kochhar DM (1967). Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **70**: 398-404.
- Kochhar DM, Jiang H, Penner JD und Heyman RA (1995). Placental transfer and developmental effects of 9-*cis* retinoic acid in mice. *Teratology* **51**: 257-265.
- Kochhar DM und Penner JD (1987). Developmental effects of isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin: the role of metabolism in teratogenicity. *Teratology* **36**: 67-75.
- Kochhar DM, Penner JD und Satre MA (1988). Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **96**: 429-441.
- Kojima R, Fujimori T, Kiyota N, Toriya Y, Fukuda T, Ohashi T, Sato T, Yoshizawa Y, Takeyama K und Mano H (1994). In vivo isomerization of retinoic acids. Rapid isomer exchange and gene expression. *J.Biol.Chem.* **269**: 32700-32707.



Korte R, Hummler H und Hendrickx AG (1993). Importance of early exposure to 13-*cis* retinoic acid to induce teratogenicity in the cynomolgus monkey. *Teratology* **47**: 37-45.

Kowalski TE, Falestiny M, Furth E und Malet PF (1994). Vitamin A hepatotoxicity: a cautionary note regarding 25,000 IU supplements. *Am.J.Med.* **97**: 523-528.

Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE und Peck GL (1988). Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *N.Engl.J.Med.* **318**: 1633-1637.

Kraft JC, Bechter R, Lee QP und Juchau MR (1992). Microinjections of cultured rat conceptuses: studies with 4-oxo-all-*trans*-retinoic acid, 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid and all-*trans*-retinoyl-beta-glucuronide. *Teratology* **45**: 259-270.

Kraft JC und Juchau MR (1995). *Xenopus laevis*: a model system for the study of embryonic retinoid metabolism. III. Isomerization and metabolism of all-*trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid and their dysmorphogenic effects in embryos during neurulation. *Drug Metab.Dispos.* **23**: 1058-1071.

Kraft JC, Schuh T, Juchau M und Kimelman D (1994). The retinoid X receptor ligand, 9-*cis*-retinoic acid, is a potential regulator of early *Xenopus* development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 3067-3071.

Kraft JC, Shepard T und Juchau MR (1993). Tissue levels of retinoids in human embryos/fetuses [see comments]. *Reprod.Toxicol.* **7**: 11-15.

Kraft JC, Slikker W, Bailey JR, Roberts LG, Fischer B, Wittfoht W und Nau H (1991). Plasma pharmacokinetics and metabolism of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid in the cynomolgus monkey and the identification of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoyl-beta-glucuronides. A comparison to one human case study with isotretinoin [published erratum appears in Drug Metab Dispos Biol Fate Chem 1991 Jul-Aug;19(4):846]. *Drug Metab.Dispos.* **19**: 317-324.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R und Blaner W (1995). Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J.Biol.Chem.* **270**: 17850-17857.

Labrecque J, Dumas F, Lacroix A und Bhat PV (1995). A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid. *Biochem.J.* **305**: 681-684.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix-AW J, an

Landes E (1994). Die Konzentrationen von Vitamin A in der Leber von Rindern und Schweinen. *Übers.Tierernährg* **22**: 281-320.

Landers GM und Olson JA (1986). Absence of isomerization of retinyl palmitate, retinol, and retinal in chlorinated and nonchlorinated solvents under gold light. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* **69**: 50-55.

Lassen HCA (1930). Vitamin A deficiency and resistance against a specific infection. A preliminary report. *J.Hygiene* **30**: 300-310.

Le NA, Coates PM, Gallagher PR und Cortner JA (1997). Kinetics of retinyl esters during postprandial lipemia in man: a compartmental model. *Metabolism* **46**: 584-594.

Lee MO, Manthey CL und Sladek NE (1991). Identification of mouse liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of retinaldehyde to retinoic acid. *Biochem.Pharmacol.* **42**: 1279-1285.

Lehman PA und Franz TJ (1996). A sensitive high-pressure liquid chromatography/particle beam/mass spectrometry assay for the determination of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid in human plasma. *J.Pharm.Sci.* **85**: 287-290.

Leid M, Kastner P und Chambon P (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends.Biochem.Sci.* **17**: 427-433.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- LeMotte PK, Keidel S und Apfel CM (1996). Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur.J.Biochem.* **236**: 328-333.
- Leo MA, Lasker JM, Raucy JL, Kim CI, Black M und Lieber CS (1989). Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch.Biochem.Biophys.* **269**: 305-312.
- Leth T (1994). Vitamin A in danish pig, calf and ox liver. *Lebensmittelchemie* **48**: 8
- Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A und et a (1992). 9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**: 359-361.
- Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M und Chambon P (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**: 643-658.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A und Chambon P (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**: 2723-2748.
- Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, LeMeur M und Chambon P (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**: 7225-7229.
- Luo J, Pasceri P, Conlon RA, Rossant J und Giguere V (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech.Dev.* **53**: 61-71.
- MacCrehan WA und Schonberger E (1987). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of retinol and its isomers. *J.Chromatogr.* **417**: 65-78.
- MacDonald PN und Ong DE (1988). Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J.Biol.Chem.* **263**: 12478-12482.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Mahadevan S, Sastry PS und Ganguly T (1963). Studies on metabolism of vitamin A. *Biochem.J.* **88**: 534-539.
- Mahoney CP, Margolis MT, Knauss TA und Labbe RF (1980). Chronic vitamin A intoxication in infants fed chicken liver. *Pediatrics* **65**: 893-897.
- Mangelsdorf DJ (1994). Vitamin A receptors. *Nutr.Rev.* **52**: S32-S44
- Mangelsdorf DJ, Umesono K und Evans RM (1994). The retinoid receptors. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 319-349. Raven Press, New York.
- Mao GM, Collins MD und Derguini F (1997). Teratogenicity of two novel retinol metabolites with *retro*-structure: 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol (14-HRR) and anhydroretinol (AR). *Teratology* **55**: 53 (abstract 72)
- Marth C, Widschwendter M und Daxenbichler G (1993). Mechanism of synergistic action of all-*trans*- or 9-*cis*-retinoic acid and interferons in breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **47**: 123-126.
- Martinez FM und Salvador J (1990). Epidemiological aspects of prenatal exposure to high doses of vitamin A in Spain. *Eur.J.Epidemiol.* **6**: 118-123.
- McCollum EV und Davis M (1913). The necessity of certain lipins in the diet during growth. *J.Biol.Chem.* **15**: 167-175.
- Meeks RG, Zaharevitz D und Chen RF (1981). Membrane effects of retinoids: possible correlation with toxicity. *Arch.Biochem.Biophys.* **207**: 141-147.
- Melhus H, Michaelsson K, Kindmark A, Bergstrom R, Holmberg L, Mallmin H, Wolk A und Ljunghall S (1998). Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann.Intern.Med.* **129**: 770-778.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Mendelsohn C, Mark M, Dolle P, Dierich A, Gaub MP, Krust A, Lampron C und Chambon P (1994). Retinoic acid receptor  $\beta 2$  (RAR $\beta 2$ ) null mutant mice appear normal. *Dev.Biol.* **166**: 246-258.
- Mertz JR, Shang E, Piantedosi R, Wei S, Wolgemuth DJ und Blaner WS (1997). Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis*-retinol oxidation. A possible role in 9-*cis*-retinoic acid formation. *J.Biol.Chem.* **272**: 11744-11749.
- Meyer VR (1992). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*, Salle und Sauerländer, Frankfurt a.M.
- Miller WHJ, Jakubowski A, Tong WP, Miller VA, Rigas JR, Benedetti F, Gill GM, Truglia JA, Ulm E und Shirley M (1995). 9-*cis* retinoic acid induces complete remission but does not reverse clinically acquired retinoid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **85**: 3021-3027.
- Miller DA und DeLuca HF (1986). Biosynthesis of retinoyl-beta-glucuronide, a biologically active metabolite of all-*trans*-retinoic acid. *Arch.Biochem.Biophys.* **244**: 179-186.
- Minucci S, Leid M, Toyama R, Saint JJ, Peterson VJ, Horn V, Ishmael JE, Bhattacharyya N, Dey A, Dawid IB und Ozato K (1997). Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol.Cell Biol.* **17**: 644-655.
- Mize CE, Avigan J, Baxter JH, Fales HM und Steinberg D (1966). Metabolism of phytol-U-14C and phytanic acid-U-14C in the rat. *J.Lipid Res.* **7**: 692-697.
- Moore T (1930). Vitamin A and carotene. The absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A *in vivo*. *Biochem.J.* **24**: 692-702.
- Muralidharan FN und Muralidharan VB (1985). In vitro conversion of phytol to phytanic acid in rat liver: subcellular distribution of activity and chemical characterization of intermediates using a new bromination technique. *Biochim.Biophys.Acta* **835**: 36-40.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Muralidharan FN und Muralidharan VB (1986). Characterization of phytol-phytanate conversion activity in rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* **883**: 54-62.

Muralidharan VB und Kishimoto Y (1984). Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver. Requirement of cytosolic factor. *J.Biol.Chem.***259**: 13021-13026.

Nagao A und Olson JA (1994). Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of beta-carotene [published erratum appears in FASEB J 1995 May;9(8):691]. *FASEB J.* **8**: 968-973.

Napoli JL (1993). Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J.Nutr.* **123**: 362-366.

Napoli JL (1994). Retinoic acid homeostasis. Prospective roles of  $\beta$ -carotene, retinol, CRBP, and CRABP. In: *Vitamin A in health and disease*. (Blomhoff, R., ed.), pp. 135-188. Marcel Dekker, New York.

Napoli JL (1996). Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **10**: 993-1001.

Napoli JL, Posch KP, Fiorella PD und Boerman MH (1991). Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of cellular retinol-binding protein (CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. *Biomed.Pharmacother.* **45**: 131-143.

Napoli JL und Race KR (1987). The biosynthesis of retinoic acid from retinol by rat tissues in vitro. *Arch.Biochem.Biophys.* **255**: 95-101.

Napoli JL und Race KR (1990). Microsomes convert retinol and retinal into retinoic acid and interfere in the conversions catalyzed by cytosol. *Biochim.Biophys.Acta* **1034**: 228-232.

Nau H (1986). Species differences in pharmacokinetics and drug teratogenesis [published erratum appears in Environ Health Perspect 1988 Apr;77:following 156]. *Environ.Health Perspect.* **70**: 113-129.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Nau H (1992). Teratogenesis, transplacental pharmacokinetics, and metabolism of some retinoids in the mouse, monkey, and human. In: *Retinoids. Progress in Research and Clinical Applications* (Livrea, M.A. & Packer, L., eds.), pp. 599-615. Marcel Dekker, New York.

Nau H (1994). Toxicokinetics and structure-activity relationships in retinoid teratogenesis. *Ann.Oncol.* **5**: S39-S43

Nau H (1995). Chemical structure-teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids. *Toxicol.Lett.* **82-83**: 975-979.

Nau H, Chahoud I, Dencker L, Lammer EJ und Scott WJ (1994). Teratogenicity of vitamin A and retinoids. In: *Vitamin A in health and disease* (Blomhoff, R., ed.), pp. 615-664. Marcel Dekker, New York.

Nelson M (1990). Vitamin A, liver consumption, and risk of birth defects [editorial]. *BMJ.* **301**: 1176

Newton DL, Henderson WR und Sporn MB (1980). Structure-activity relationships of retinoids in hamster tracheal organ culture. *Cancer Res.* **40**: 3413-3425.

Nonnecke BJ, Horst RL, Dubeski PL und Reinhardt TA (1997). Reactivity and phenotype of mononuclear leukocytes from nongravid heifers after in vitro exposure to 9,13-di-*cis*-retinoic acid. *J.Dairy.Sci.* **80**: 2833-2841.

Noy N und Xu ZJ (1990). Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells. *Biochemistry* **29**: 3878-3883.

Olson JA (1994). Needs and sources of carotenoids and vitamin A. *Nutr.Rev.* **52**: S67-S73

Ong DE (1984). A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization. *J.Biol.Chem.* **259**: 1476-1482.

Ong DE (1994). Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr.Rev.* **52**: S24-S31

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Ong DE und Chytil F (1975). Retinoic acid-binding protein in rat tissue. Partial purification and comparison to rat tissue retinol-binding protein. *J.Biol.Chem.* **250**: 6113-6117.

Ong DE und Chytil F (1975). Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity. *Nature* **255**: 74-75.

Ong DE, Crow JA und Chytil F (1982). Radioimmunochemical determination of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding proteins in cytosols of rat tissues. *J.Biol.Chem.* **257**: 13385-13389.

Ong DE, Kakkad B und MacDonald PN (1987). Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine [published erratum appears in J Biol Chem 1987 May 25;262(15):7438]. *J.Biol.Chem.* **262**: 2729-2736.

Ong DE, Lucas PC, Kakkad B und Quick TC (1991). Ontogeny of two vitamin A-metabolizing enzymes and two retinol-binding proteins present in the small intestine of the rat. *J.Lipid Res.* **32**: 1521-1527.

Ong DE und Page DL (1987). Cellular retinol-binding protein (type two) is abundant in human small intestine. *J.Lipid Res.* **28**: 739-745.

Orfanos CE, Ehlert R und Gollnick H (1987). The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **34**: 459-503.

Osborne TB und Mendel LB (1913). The relation of growth to the chemical constituents of the diet. *J.Biol.Chem.* **15**: 311-326.

Ottonello S, Scita G, Mantovani G, Cavazzini D und Rossi GL (1993). Retinol bound to cellular retinol-binding protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis. *J.Biol.Chem.* **268**: 27133-27142.



## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Pearce JC, Jelly JA, Fernandes KA, Leavens WJ und McDowall RD (1986). Analysis of 5-(4-acetamidophenyl)pyrazin-2(1H)-one (SK%F 94120) in plasma with an analytichem automated sample processor liquid chromatography module. *J.Chromatogr.* **353**: 371-378.
- Pahan K, Gulati S und Singh I (1994). Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* **1201**: 491-497.
- Pahan K und Singh I (1993). Intraorganellar localization of CoASH-independent phytanic acid oxidation in human liver peroxisomes. *FEBS Lett* **333**: 154-158.
- Pappas RS, Newcomer ME und Ong DE (1993). Endogenous retinoids in rat epididymal tissue and rat and human spermatozoa. *Biol.Reprod.* **48**: 235-247.
- Peck GL, Olsen TG, Yoder FW, Strauss JS, Downing DT, Pandya M, Butkus D und Arnaud BJ (1979). Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-*cis*-retinoic acid. *N.Engl.J.Med.* **300**: 329-333.
- Pervaiz S und Brew K (1985). Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science* **228**: 335-337.
- Pinkus LM (1981). Separation and use of enterocytes. *Methods Enzymol.* **77**: 154-162.
- Poirier H, Braissant O, Niot I, Wahli W und Besnard P (1997). 9-*cis*-retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene. *FEBS Lett.* **412**: 480-484.
- Porter SB, Fraker LD, Chytil F und Ong DE (1983). Localization of cellular retinol-binding protein in several rat tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **80**: 6586-6590.
- Posch KC, Boerman MH, Burns RD und Napoli JL (1991). Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis. *Biochemistry* **30**: 6224-6230.
- Posch KC, Burns RD und Napoli JL (1992). Biosynthesis of all-*trans*-retinoic acid from retinal. Recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* **267**: 19676-19682.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Posch KC, Enright WJ und Napoli JL (1989). Retinoic acid synthesis by cytosol from the alcohol dehydrogenase negative deer mouse. *Arch.Biochem.Biophys.* **274**: 171-178.

Quick TC und Ong DE (1990). Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biochemistry* **29**: 11116-11123.

Ranald UB, Lausecker BB und Huselton C (1993). Micro liquid chromatography-mass spectrometry with direct liquid introduction used for separation and quantitation of all-*trans*- and 13- *cis*-retinoic acids and their 4-oxo metabolites in human plasma. *J.Chromatogr.* **617**: 129-135.

Rando RR (1994). Retinoid isomerization reactions in the visual system. In: *Vitamin A in Health and Disease*. (Blomhoff, R., ed.), pp. 503-529. Marcel Dekker, New York.

Randolph RK und Simon M (1993). Characterization of retinol metabolism in cultured human epidermal keratinocytes. *J.Biol.Chem.* **268**: 9198-9205.

Rask L und Peterson PA (1976). In vitro uptake of vitamin A from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small intestine. *J.Biol.Chem.* **251**: 6360-6366.

Rees JL, Daly AK und Redfern CP (1989). Differential expression of the alpha and beta retinoic acid receptors in tissues of the rat. *Biochem.J.* **259**: 917-919.

Reichrath J, Mittmann M, Kamradt J und Muller SM (1997). Expression of retinoid-X receptors (-alpha, -beta, -gamma) and retinoic acid receptors (-alpha, -beta, -gamma) in normal human skin: an immunohistochemical evaluation. *Histochem.J.* **29**: 127-133.

Reynolds DJ, Marks R, Davies MG und Dykes PJ (1978). The fatty acid composition of skin and plasma lipids in Refsum's disease. *Clin Chim Acta* **90**: 171-177.

Roberts AB, Lamb LC und Sporn MB (1980). Metabolism of all-*trans*-retinoic acid in hamster liver microsomes: oxidation of 4-hydroxy- to 4-keto-retinoic acid. *Arch.Biochem.Biophys* **199**: 374-383.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Roberts AB, Nichols MD, Newton DL und Sporn MB (1979). In vitro metabolism of retinoic acid in hamster intestine and liver. *J.Biol.Chem.* **254**: 6296-6302.

Roberts ES, Vaz AD und Coon MJ (1992). Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol.Pharmacol.* **41**: 427-433.

Rodahl K und Moore T (1943). The vitamin A content and toxicity of bear and seal liver. *Biochem.J.* **37**: 166-168.

Roels OA, Anderson OR, Lui NST, Shah DO und Trout ME (1969). Vitamin A and membranes. *Am.J.Clin.Nutr.* **22**: 1020-1032.

Ronne H, Ocklind C, Wiman K, Rask L, Obrink B und Peterson PA (1983). Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin A on the secretion of the retinol-binding protein. *J.Cell Biol.* **96**: 907-910.

Rosa FW (1983). Teratogenicity of isotretinoin. *Lancet* **2**: 513

Rosa FW (1993). Retinoid embryopathy in humans. In: *Retinoids in Clinical Practice. The Risk-benefit Ratio* (Koren, G., ed.), pp. 77-109. Marcel Dekker, New York.

Rosa FW, Wilk AL und Kelsey FO (1986). Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology* **33** : 355-364.

Ross AC und Hämmerling UG (1994). Retinoids and the immune system. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*. (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 521-543. Raven Press, New York.

Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S und Milunsky A (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N.Engl.J.Med.* **333**: 1369-1373.

Rousset M (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **86**: 1035-1040.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Rowland M und Tozer TN (1989). *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications*, Ed.2nd, Lea and Febiger, Philadelphia.

Roy B, Taneja R und Chambon P (1995). Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Mol.Cell Biol.* **15**: 6481-6487.

Ruberte E, Dolle P, Chambon P und Morriss KG (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* **111**: 45-60.

Ruberte E, Friederich V, Chambon P und Morriss KG (1993). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* **118**: 267-282.

Saari JC (1994). Retinoids in photosensitive systems. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 351-385. Raven Press, New York.

Said HM, Ong DE und Shingleton JL (1989). Intestinal uptake of retinol: enhancement by bovine milk beta-lactoglobulin. *Am.J.Clin.Nutr.* **49**: 690-694.

Sakashita A, Kizaki M, Pakkala S, Schiller G, Tsuruoka N, Tomosaki R, Cameron JF, Dawson MI und Koeffler HP (1993). 9-*cis*-retinoic acid: effects on normal and leukemic hematopoiesis in vitro. *Blood* **81**: 1009-1016.

Sakhi AK, Gundersen TE, Ulven SM, Blomhoff R und Lundanes E (1998). Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *J.Chromatogr. A* **828**: 451-460.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Salyers KL, Cullum ME und Zile MH (1993). Glucuronidation of all-*trans*-retinoic acid in liposomal membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **1152**: 328-334.

Sani BP, Shealy YF und Hill DL (1995). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: interactions with retinoid-binding proteins/receptors. *Carcinogenesis* **16**: 2531-2534.

Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P und Dolle P (1997). Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev.Dyn.* **208**: 199-210.

Sass, J. O. Untersuchungen zum Metabolismus und plazentaren Transfer von Retinoiden (Vitamin-A-Derivaten) unter besonderer Berücksichtigung der Retinoylglukuronide. 1996. Dissertation Fachbereich Chemie. Freie Universität Berlin.

Sass JO, Didierjean L, Carraux P, Plum C, Nau H und Saurat JH (1996). Metabolism of topical retinaldehyde and retinol by mouse skin in vivo: predominant formation of retinyl esters and identification of 14-hydroxy-4, 14-retro-retinol. *Exp.Dermatol.* **5**: 267-271.

Sass JO, Forster A, Bock KW und Nau H (1994). Glucuronidation and isomerization of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid by liver microsomes of phenobarbital- or 3-methylcholanthrene-treated rats. *Biochem.Pharmacol.* **47**: 485-492.

Sass JO, Hartmann J, Chahoud I, Shroot B und Nau H (1995). Transplacental pharmacokinetics of a synthetic retinoid which is not bound by mouse embryonic cellular retinoic acid-binding protein. *Toxicol.Lett.* **75**: 159-168.

Sass JO, Masgrau E, Saurat JH und Nau H (1995). Metabolism of oral 9-*cis*-retinoic acid in the human. Identification of 9-*cis*-retinoyl-beta-glucuronide and 9-*cis*-4-oxo-retinoyl-beta-glucuronide as urinary metabolites. *Drug Metab.Dispos.* **23**: 887-891.

Sass JO und Nau H (1994a). Single-run analysis of isomers of retinoyl- $\beta$ -D-glucuronide and retinoic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A* **685**: 182-188.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Sass JO, Tzimas G und Nau H (1994b). 9-*cis*-retinoyl-beta-D-glucuronide is a major metabolite of 9-*cis*-retinoic acid [published erratum appears in Life Sci 1994;54(17):PL311]. *Life Sci.* **54**: L69-L74
- Satre MA, Ugen KE und Kochhar DM (1992). Developmental changes in endogenous retinoids during pregnancy and embryogenesis in the mouse. *Biol.Reprod.* **46**: 802-810.
- Saurat JH, Didierjean L, Masgrau E, Piletta PA, Jaconi S, Chatellard GD, Gumowski D, Masouye I, Salomon D und Siegenthaler G (1994). Topical retinaldehyde on human skin: biologic effects and tolerance. *J.Invest.Dermatol.* **103**: 770-774.
- Scott-WJ J, Walter R, Tzimas G, Sass JO, Nau H und Collins MD (1994). Endogenous status of retinoids and their cytosolic binding proteins in limb buds of chick vs mouse embryos. *Dev.Biol.* **165**: 397-409.
- Shapiro SS, Mott DJ und Machlin LJ (1984). Kinetic characteristics of  $\beta$ -carotene uptake and depletion in rat tissue. *J.Nutr.* **114**: 1924-1933.
- Sharma RV, Mathur SN, Dmitrovski AA, Das RC und Ganguly J (1977). Studies on the metabolism of  $\beta$ -Carotene and apo- $\beta$ -carotenoids in rats and chickens. *Biochim.Biophys.Acta* **486**: 183-194.
- Shaw GM, Wasserman CR, Block G und Lammer EJ (1996). High maternal vitamin A intake and risk of anomalies of structures with a cranial neural crest cell contribution [letter; comment]. *Lancet* **347**: 899-900.
- Shenefelt RE (1972). Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* **5**: 103-118.
- Shih TW, Lin TH, Shealy YF und Hill DL (1997). Nonenzymatic isomerization of 9-*cis*-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *Drug Metab.Dispos.* **25**: 27-32.
- Shih TW, Shealy YF, Strother DL und Hill DL (1986). Nonenzymatic isomerization of all-*trans*- and 13-*cis*-retinoids catalyzed by sulfhydryl groups. *Drug Metab.Dispos.* **14**: 698-702.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Siegenthaler G (1990). Retinoic acid formation from retinol and retinal metabolism in epidermal cells. *Methods Enzymol.* **189**: 530-536.
- Singh I, Pahan K, Dhaunsi GS, Lazo O und Ozand P (1993). Phytanic acid alpha-oxidation. Differential subcellular localization in rat and human tissues and its inhibition by nycodenz. *J.Biol.Chem* **268**: 9972-9979.
- Sivaprasadarao A und Findlay JB (1988). The interaction of retinol-binding protein with its plasma-membrane receptor. *Biochem.J.* **255**: 561-569.
- Smeland S, Bjerknes T, Malaba L, Eskild W, Norum KR und Blomhoff R (1995). Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein. *Biochem.J.* **305**: 419-424.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson A, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ und Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**: 76-85.
- Sommer A (1994). Vitamin A: its effect on childhood sight and life. *Nutr.Rev.* **52**: S60-S66
- Soprano DR und Soprano KJ (1995). Retinoids as teratogens. *Annu.Rev.Nutr.* **15**: 111-132.
- Sporn MB und Roberts AB (1985). What is a retinoid? *Ciba.Found.Symp.* **113**: 1-5.
- Stancher B und Zonta F (1984). High-performance liquid chromatography of the unsaponifiable from samples of marine and freshwater fish: fractionation and identification of retinol (vitamin A1) and dehydroretinol (vitamin A2) isomers. *J.Chromatogr.* **287**: 353-364.
- Steinberg D. Refsum Disease. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds.). pp2351-2369. McGraw-Hill, New York.
- Steinberg D, Avigan J, Mize C, Eldjarn L, Try K und Refsum S (1965). Conversion of U-C14-phytol to phytanic acid and its oxidation in heredopathia atactica polyneuritiformis. *Biochem Biophys.Res.Comm.* **19**: 783-789.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Steinberg D, Avigan J, Mize CE, Baxter JH, Cammermeyer J, Fales HM und Highet PF (1966a). Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals. *J.Lipid Res.* **7**: 684-691.
- Steinberg D, Avigan J, Mize C und Baxter JH. Phytanic acid formation and accumulation in phytol-fed rats (1966b). *Fed. Proc.* **24**: 290
- Stüttgen G (1986). Historical perspectives of tretinoin. *J.Am.Acad.Dermatol.* **15**: 735-740.
- Stüttgen G (1962). Zur Lokalbehandlung von Keratosen mit Vitamin-A-Säure. *Dermatologica* **124**: 65-80.
- Sutherland L, Ebner T und Burchell B (1993). The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem.Pharmacol.* **45**: 295-301.
- Suzuki R, Goda T und Takase S (1995). Consumption of excess vitamin A, but not excess beta-carotene, causes accumulation of retinol that exceeds the binding capacity of cellular retinol-binding protein, type II in rat intestine. *J.Nutr.* **125**: 2074-2082.
- Suzuki T, Ezure T und Ishida M (1998). Synergistic effects of some pairs of antioxidants and related agents on mouse leukaemia L5178Y cell growth in-vitro. *J.Pharm.Pharmacol.* **50**: 1173-1177.
- Swanson BN, Frolik CA, Zaharevitz DW, Roller PP und Sporn MB (1981). Dose-dependent kinetics of all-*trans*-retinoic acid in rats. Plasma levels and excretion into bile, urine, and faeces. *Biochem.Pharmacol.* **30**: 107-113.
- Takahashi N und Breitman TR (1994). Retinoylation of proteins in mammalian cells. In: *Vitamin A in Health and Disease*. (Blomhoff, R., ed.), pp. 257-273. Marcel Dekker, New York.
- Tang GW und Russell RM (1990). 13-*cis*-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J.Lipid Res.* **31**: 175-182.



## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Thaller C und Eichele G (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* **327**: 625-628.
- Thaller C und Eichele G (1988). Characterization of retinoid metabolism in the developing chick limb bud. *Development* **103**: 473-483.
- Thaller C und Eichele G (1990). Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud.. *Nature* **345**: 815-819.
- Thaller C, Hofmann C und Eichele G (1993). 9-*cis*-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplications in the chick wing bud. *Development* **118**: 957-965.
- Theiler R, Wirth HP, Flury R, Hanck A und Michel BA (1993). [Chronic vitamin A poisoning with musculoskeletal symptoms and morphological changes of the liver: a case report] Chronische Vitamin-A-Intoxikation mit muskulo-skelettalen Beschwerden und morphologischen Veränderungen der Leber: eine Fallbeschreibung. *Schweiz.Med.Wochenschr.* **123**: 2405-2412.
- Thompson JN, Howell JM und Pitt GAJ (1964). Vitamin A and reproduction in rats. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* **159**: 510-535.
- Tsonis PA, Sargent MT, Del-Rio-Tsonis K und Jung JC (1996). 9-*cis* retinoic acid antagonizes the stimulatory effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells: interactions of their receptors. *Int.J.Dev.Biol.* **40**: 1053-1059.
- Tzimas G, Burgin H, Collins MD, Hummler H und Nau H (1994). The high sensitivity of the rabbit to the teratogenic effects of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin) is a consequence of prolonged exposure of the embryo to 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxo-retinoic acid, and not of isomerization to all-*trans*-retinoic acid. *Arch.Toxicol.* **68**: 119-128.
- Tzimas G, Collins MD, Burgin H, Hummler H und Nau H (1996). Embryotoxic doses of vitamin A to rabbits result in low plasma but high embryonic concentrations of all-*trans*-retinoic acid: risk of vitamin A exposure in humans. *J.Nutr.* **126**: 2159-2171.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Tzimas G, Collins MD und Nau H (1995). Developmental stage-associated differences in the transplacental distribution of 13-*cis*- and all-*trans*-retinoic acid as well as their glucuronides in rats and mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **133**: 91-101.

Tzimas G, Collins MD und Nau H (1996). Identification of 14-hydroxy-4,14-retro-retinol as an in vivo metabolite of vitamin A. *Biochim.Biophys.Acta* **1301**: 1-6.

Tzimas G, Nau H, Hendrickx AG, Peterson PE und Hummler H (1996). Retinoid metabolism and transplacental pharmacokinetics in the cynomolgus monkey following a nonteratogenic dosing regimen with all-*trans*-retinoic acid. *Teratology* **54**: 255-265.

Tzimas G, Sass JO, Wittfoht W, Elmazar MM, Ehlers K und Nau H (1994). Identification of 9,13-dicis-retinoic acid as a major plasma metabolite of 9-*cis*-retinoic acid and limited transfer of 9-*cis*-retinoic acid and 9,13-dicis-retinoic acid to the mouse and rat embryos. *Drug Metab.Dispos.* **22**: 928-936.

Tzimas G, Thiel R, Chahoud I und Nau H (1997). The area under the concentration-time curve of all-*trans*-retinoic acid is the most suitable pharmacokinetic correlate to the embryotoxicity of this retinoid in the rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **143**: 436-444.

Underwood BA (1984). Vitamin A in animal and human nutrition. In: *The Retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A.B. & Goodman, D.S., eds.), pp. 281-392. Academic Press, Orlando.

Urbach J und Rando RR (1994). Isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *Biochem.J.* **299**: 459-465.

Urbach J und Rando RR (1994). Thiol dependent isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *FEBS Lett.* **351**: 429-432.

Vahlquist A (1982). Vitamin A in human skin: I. detection and identification of retinoids in normal epidermis. *J.Invest.Dermatol.* **79**: 89-93.

Vahlquist A und Nilsson S (1984). Vitamin A transfer to the fetus and to the amniotic fluid in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Ann.Nutr.Metab.* **28**: 321-333.

- Van-Breemen RB und Huang CR (1996). High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of retinoids. *FASEB J.* **10**: 1098-1101.
- Van Breemen RB, Nikolic D, Xu X, Xiong Y, van-Lieshout M, West CE und Schilling AB (1998). Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J.Chromatogr.A* **794**: 245-251.
- Van Pelt AM und de-Rooij DG (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* **128**: 697-704.
- Van Soest S, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM und Bergen AA (1999). Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv.Ophthalmol.* **43**: 321-334.
- Vane FM, Bugge CJ, Rodriguez LC, Rosenberger M und Doran TI (1990). Human biliary metabolites of isotretinoin: identification, quantification, synthesis, and biological activity. *Xenobiotica* **20**: 193-207.
- Verhoeven NM, Wanders RJ, Schor DS, Jansen GA und Jakobs C (1997). Phytanic acid alpha-oxidation: decarboxylation of 2-hydroxyphytanoyl- CoA to pristanic acid in human liver. *J.Lipid Res.* **38**: 2062-2070.
- Wald G (1934). Carotenoids and the vitamin A cycle in vision. *Nature* **134**: 65
- Wald G (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science* **162**: 230-239.
- Wanders RJ, van Roermund CW, Schor DS, ten Brink HJ und Jakobs C (1994). 2-Hydroxyphytanic acid oxidase activity in rat and human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome. *Biochim.Biophys.Acta* **1227**: 177-182.
- Wang XD, Krinsky NI, Benotti PN und Russell RM (1994). Biosynthesis of 9-*cis*-retinoic acid from 9-*cis*-beta-carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch.Biochem.Biophys.* **313**: 150-155.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Wang XD, Tang GW, Fox JG, Krinsky NI und Russell RM (1991). Enzymatic conversion of beta-carotene into beta-apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues. *Arch.Biochem.Biophys.* **285**: 8-16.
- Ward SJ, Chambon P, Ong DE und Bavik C (1997). A retinol-binding protein receptor-mediated mechanism for uptake of vitamin A to postimplantation rat embryos. *Biol.Reprod.* **57**: 751-755.
- Warrell-RP J, Frankel SR, Miller-WH J, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A und Jakubowski A (1991). Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). *N.Engl.J.Med.* **324**: 1385-1393.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME und Blaner WS (1995). Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J.Biol.Chem.* **270**: 866-870.
- Weiser H und Somorjai G (1992). Bioactivity of *cis* and *dicis* isomers of vitamin A esters. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* **62**: 201-208.
- Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L und Mitchell AA (1990). Maternal vitamin A supplementation in relation to selected birth defects. *Teratology* **42**: 497-503.
- White JA, Beckett JB, Guo YD, Dilworth FJ, Bonasoro J, Jones G und Petkovich M (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J.Biol.Chem.* **272**: 18538-18541.
- Willhite CC, Dawson MI und Reichert U (1996). Receptor-selective retinoid agonists and teratogenic activity. *Drug Metab.Rev.* **28**: 105-119.
- Willhite CC und Shealy YF (1984). Amelioration of embryotoxicity by structural modification of the terminal group of cancer chemopreventive retinoids. *J.Natl.Cancer Inst.* **72**: 689-695.
- Willhite CC, Wier PJ und Berry DL (1989). Dose-response and structure-activity considerations in retinoid-induced dysmorphogenesis. *Crit.Rev.Toxicol.* **20**: 113-135.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

- Wilson JG, Roth B und Warkany J (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am.J.Anat.* **92**: 189-217.
- Wolbach SB und Howe PR (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J.Exp.Med.* **45**: 753-778.
- Wolf G (1978). A historical note on the mode of administration of vitamin A for the cure of night blindness. *Am.J.Clin.Nutr.* **31**: 290-292.
- Wolf G (1995). Retinol transport and metabolism in transthyretin-"knockout" mice. *Nutr.Rev.* **53**: 98-99.
- Wolfrum C, Ellinghaus P, Fobker M, Seedorf U, Assmann G, Borchers T und Spener F (1999). Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J.Lipid Res.* **40**: 708-714.
- Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D und Burchell B (1993). Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* **82**: 119-129.
- Wyss R (1995). Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.* **671**: 381-425.
- Yamagata T, Momoi MY, Yanagisawa M, Kumagai H, Yamakado M und Momoi T (1994). Changes of the expression and distribution of retinoic acid receptors during neurogenesis in mouse embryos. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **77**: 163-176.
- Yamaguchi K, Groopman JE und Byrn RA (1994). The regulation of HIV by retinoic acid correlates with cellular expression of the retinoic acid receptors. *AIDS* **8**: 1675-1682.
- Zhang X-K und Pfahl M (1993). Regulation of retinoid and thyroid hormone action through monodimeric and heterodimeric receptors. *TEM* **4**: 156-162.

## 7 - Literaturverzeichnis

---

Zile M und DeLuca HF (1968). Retinoic acid: some aspects of growth-promoting activity in the albino rat. *J.Nutr.* **94**: 302-308.

Zile MH, Emerick RJ und DeLuca HF (1967). Identification of 13-*cis* retinoic acid in tissue extracts and its biological activity in rats. *Biochim.Biophys.Acta* **141**: 639-641.

Zile MH, Inhorn RC und DeLuca HF (1982). Metabolism in vivo of all-*trans*-retinoic acid. Biosynthesis of 13-*cis*-retinoic acid and all-*trans*- and 13-*cis*-retinoyl glucuronides in the intestinal mucosa of the rat. *J.Biol.Chem.* **257**: 3544-3550.

### **8 Anhang**

#### **8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
APCI	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck ( <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> )
AP	Alkalische Phosphatase
APL	Akute promyelocytische Leukämie
ARAT	Acyl-CoA:Retinol Acyl-Transferase
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ( <i>area under the concentration-time curve</i> )
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CEH	Carboxylester-Hydrolase
CM	Chylomikronen
C <sub>max</sub>	Maximale Konzentration (im Verlauf einer Kinetik)
CMR	Chylomikronen-Remnants
CRABP	Zelluläres Retinsäure-bindendes Protein ( <i>cellular retinoic acid-binding protein</i> )
CRBP	Zelluläres Retinol-bindendes Protein ( <i>cellular retinol-binding protein</i> )
DAD	Diodenarray-Detektor
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddRA	3,4-didehydro-Retinsäure
ddROH	3,4-didehydro-Retinol (Vitamin A <sub>2</sub> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FABP	Fettsäure-bindendes Protein ( <i>fatty acid-binding protein</i> )
GD	Gestationstag
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
IU	Internationale Einheit ( <i>international unit</i> ); 1 IU = 0,3 µg Retinol
KG	Körpergewicht
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
kV	Kilovolt
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )

LDL	Low Density Lipoproteine
LRAT	Lecithin:Retinol Acyl-Transferase
MS	Massenspektrometrie
NL	<i>Normalized Level</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PA	Phytansäure ( <i>phytanic acid</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
POH	Phytol
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
RA	Retinsäure ( <i>retinoic acid</i> )
RAG	Retinoyl- $\beta$ -D-glukuronid
RAR	Retinsäure-Rezeptor ( <i>retinoic acid receptor</i> )
RBP	Retinol-bindendes Protein ( <i>retinol-binding protein</i> )
RoDH	Retinol-Dehydrogenase
ROH	Retinol
ROG	Retinyl- $\beta$ -D-glukuronid
RXR	Retinoid X Rezeptor
SCAD	Dehydrogenase kurzkettiger Alkohole ( <i>short chain alcohol dehydrogenase</i> )
SIM	Selektiver Ionen-Modus ( <i>selected ion mode</i> )
TIC	Totalionen-Strom ( <i>total ion current</i> )
T <sub>max</sub>	Zeitpunkt des Auftretens der C <sub>max</sub>
TTR	Transthyretin (Präalbumin)
V <sub>max</sub>	Maximale Umsatzgeschwindigkeit

### 8.2 Tabellen und Abbildungen



## **Tabelle I**

### **Probandendaten und klinische Parameter (Plasma) zur Humanstudie**

<b>No.</b>	<b>Alter</b>	<b>Gewicht (kg)</b>	<b>Größe (cm)</b>	<b>WBC (x1000/<math>\mu</math>l)</b>	<b>W-SCR (%)</b>	<b>W-LCR (%)</b>	<b>RBC (x1000/<math>\mu</math>l)</b>	<b>HCT (%)</b>	<b>PLT (x1000/<math>\mu</math>l)</b>	<b>HGB (g/dl)</b>
<b>I</b>	32	76	180	5,1	42,3	57,7	5020	45,2	307	14,8
<b>II</b>	27	85	192	4,9	34,7	65,3	5220	47,9	235	15,7
<b>III</b>	24	70	176	5,2	44,2	55,8	4700	43,4	192	13,9
<b>IV</b>	26	69	180	6,7	41,8	58,2	5250	50,2	312	16,3
<b>V</b>	27	108	188	4,1	34,1	65,9	5240	50,6	211	16,6
<b>VI</b>	28	94	188	6,0	48,3	51,7	5050	43,7	146	14,0
<b>VII</b>	24	83	189	6,8	32,4	67,6	4780	43,3	217	14,8
<b>VIII</b>	24	86	184	6,5	40,0	60,0	5120	45,5	218	15,2
<b>IX</b>	25	65	187	7,3	19,2	80,8	5100	48,2	194	16,0
<b>X</b>	24	84	190	5,5	43,6	56,4	6010	46,5	276	15,8
Norm*	m = 26	m = 82	m = 185.4	4,8 bis 10	20 bis 40	60 bis 80	4600 bis 6200	40 bis 52	150 bis 400	14-18

**Bei Alter, Körpergewicht und Größe wurden die Mittelwerte errechnet, bei den übrigen Parametern wurden der Literatur Normwerte entnommen.**

\* Normwerte aus: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 1994.

**WBC:** White Blood Cells = Leukozyten; **W-SCR:** White - Small Count Rate = Lymphozyten; **W-LCR:** White - Large Count Rate = Monozyten und Granulozyten; **RBC:** Red Blood Cells = Erythrozyten; **HCT:** Hämatokrit; **PLT:** Platelets = Thrombozyten; **HGB:** Hämoglobin

**Tabelle I (Forts.)**

No.	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	AP (U/l)	GGT (U/l)	Kreatinin (µmol/l)	Harnstoff (mmol/l)
I	89,8	29,1	32,4	10	21	106	18	91	5,3
II	91,8	30,1	32,8	14	16	89	26	85	5
III	92,3	29,6	32,0	11	7	106	5	91	5,7
IV	95,6	31,0	32,5	10	8	99	7	74	4,3
V	96,6	31,7	32,8	11	12	113	13	80	5,2
VI	86,5	27,7	32,0	9	6	89	6	80	4,5
VII	90,6	31,0	34,2	11	8	120	6	85	4,9
VIII	88,9	29,7	33,4	8	5	114	5	82	4,5
IX	94,5	31,4	33,2	9	9	137	7	94	5,8
X	87,7	29,8	34,0	11	9	84	5	86	4,3
Norm*	82 bis 92	28 bis 32	30 bis 36	4 bis 22	4 bis 17	20 bis 180	4 bis 28	50 bis 110	1,7 bis 8,3

\* Normwerte aus: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 1994.

**MCHC:** Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; **MCV:** Mittleres Korpuskuläres Erythrozytenvolumen; **GOT:** Glutamat - Oxalacetat - Transaminase; **GPT:** Glutamat - Pyruvat - Transaminase; **AP:**Alkalische Phosphatase; **GGT:** Gamma - Glutamyl - Transferase.

## Tabelle II

### Überblick über die in dieser Arbeit angewandten Probenaufbereitungen und HPLC-Methoden

Probenvorbereitung	Matrix	HPLC-Methode	Bemerkungen
A <ul style="list-style-type: none"> <li>Extraktion mit 3-fachem Volumen Isopropanol</li> <li>Festphasenextraktion an C2-Material</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasma (100 µl)</li> <li>Kulturmedium</li> <li>Embryo (Homogenisierung)</li> <li>Leber (Homogenisierung/Verdünnung)</li> </ul>	I Gradient 60 mM Ammoniumacetat/ Methanol (31 min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bestimmung von polaren und unpolaren Retinoiden</li> <li>Koelution 13-cis-RA/ 9,13-di-cis-RA</li> </ul>
B <ul style="list-style-type: none"> <li>Festphasenextraktion an C2-Material</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasma (350 µl)</li> <li>Kulturmedium</li> </ul>	II Gradient 60 mM Ammoniumacetat/ Methanol (17 min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bestimmung von polaren Retinoiden (RA, 4-oxo-RA, RAG, 14-HRR)</li> <li>9,13-di-cis-RA wird nicht erfaßt</li> </ul>
B <ul style="list-style-type: none"> <li>Extraktion mit 3-fachem Volumen Isopropanol</li> <li>Festphasenextraktion an C2-Material (2 x nacheinander)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasma (200 µl)</li> </ul>	III Gradient Wasser/Acetonitril (mit 0,2 Vol.-% TFA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Auftrennung und Bestimmung aller 4 RA-Isomere (13-cis-, 9,13-di-cis-9-cis- und all-trans-RA)</li> </ul>
C <ul style="list-style-type: none"> <li>Extraktion mit Isopropanol</li> <li>Festphasenextraktion an C2-Material</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leber (Homogenisierung/Verdünnung)</li> </ul>	IV Gradient Methanol/Ammoniumacetat Isopropanol/Aceton	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bestimmung von Retinol und Retinylestern auf kurzer HPLC-Säule</li> </ul>
D <ul style="list-style-type: none"> <li>Flüssig-flüssig-Extraktion (auf Extrelut)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leber (Homogenisierung/Verdünnung)</li> <li>Plasma</li> </ul>	V Isokratische Trennung mit n-Hexan/n-Oktanol auf Normalphasen-Material	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bestimmung von Isomeren des Retinols</li> </ul>
E <ul style="list-style-type: none"> <li>(Extraktion mit 3-fachem Volumen Isopropanol)</li> <li>(Festphasenextraktion an C2-Material)</li> <li>(Elution mit Methanol)</li> <li>Vakuumkonzentration</li> <li>Wiederaufnehmen in 100 µl Lösungsmittel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gesammelte Peakfraktionen (ohne vorherige Extraktion)</li> <li>Plasma (100 µl)</li> <li>Embryo (Homogenisierung)</li> </ul>	VI Gradient 60 mM Ammoniumacetat/ Methanol (31 min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bestimmung von polaren und unpolaren Retinoiden mittels LC-DAD-MS<sup>n</sup></li> <li>Koelution 13-cis-RA/ 9,13-di-cis-RA</li> </ul>

**Tabelle III**

**Teratogene Effekte in trächtigen NMRI-Mäusen (GD 8,25) nach oralen Einzelgaben von Phytol (POH, 500 mg/kg KG), Phytansäure (PA, 100 mg/kg KG), all-*trans*-RA (RA, 20 mg/kg KG) und Retinol (ROH, 50 mg/kg) oder nach gleichzeitiger Gabe von RA mit POH oder PA bzw. ROH mit POH oder PA\***

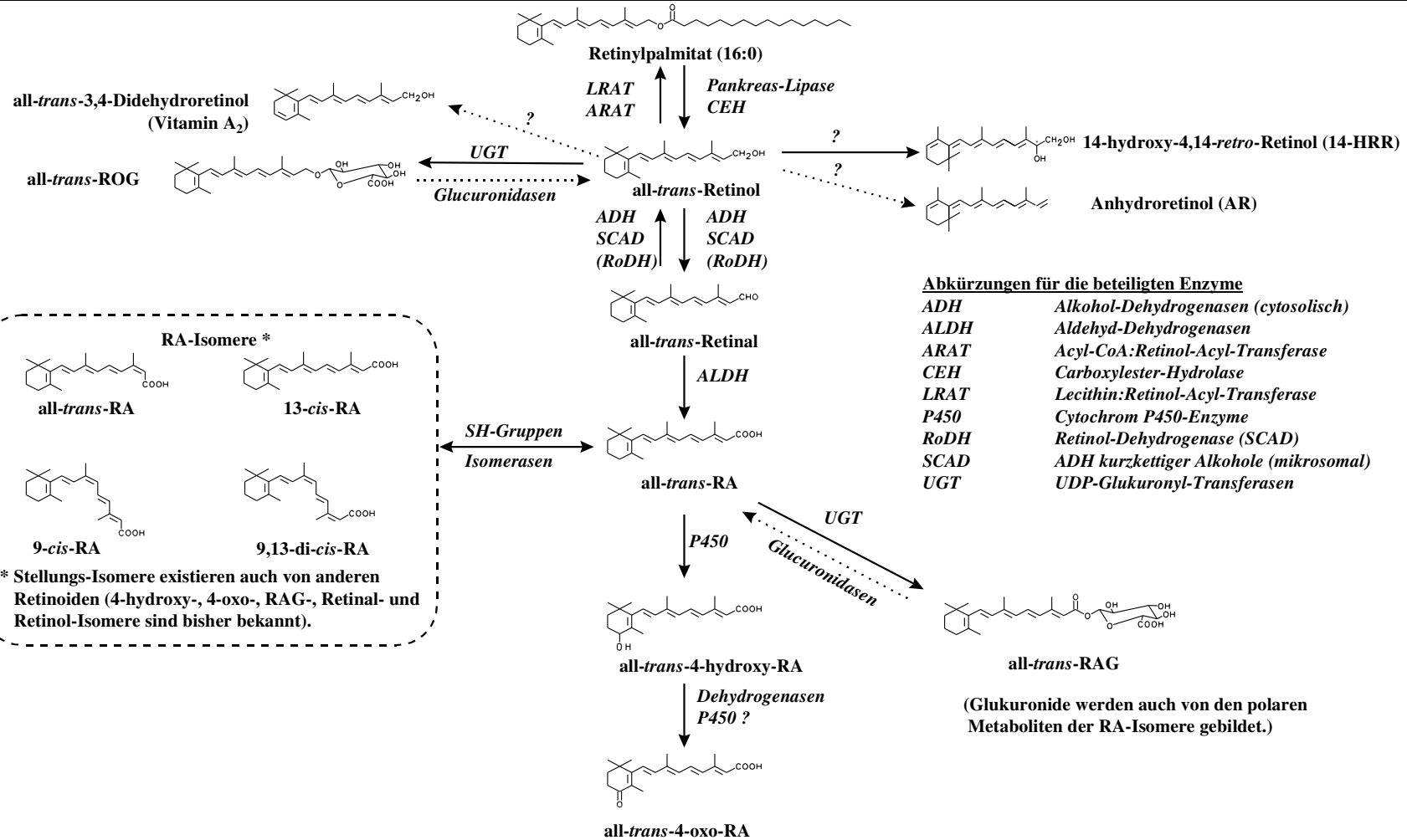
	POH	PA	RA	RA+POH	RA+PA	ROH	ROH+POH	ROH+PA
Lebende Feten	62	51	58	74	66	90	88	78
Resorptionen (%)**	2 (3)	13 (20)	45 (44)	33 (31)	36 (35)	57 (39)	5 (5)	17 (18)
Spina Bifida (%)**	0	0	1 (2)	1 (1,4)	1 (1,5)	0	0	0
Mikrognathie (%)**	0	0	0	1 (1,4)	1 (1,5)	0	0	0
Ohr Anotie (%)**	0	0	7 (12)	3 (4)	15 (23)	19 (21)	0	1 (1,3)
Schwanzmißbildungen (%)**	0	0	13 (22)	0	13 (20)	1 (1)	0	0
Exenzephalie (%)**	0	0	10 (17)	10 (14)	13 (20)	25 (28)	0	0
Fetengewichte (g)	1,26 ± 0,13	1,18 ± 0,13	1,18 ± 0,13	1,18 ± 0,12	1,17 ± 0,13	1,23 ± 0,14	1,29 ± 0,13	1,23 ± 0,10

\* Alle Substanzen wurden in Cremophor EL (25% w/v in Wasser) mit einem Dosisvolumen von 5 ml/kg KG gelöst.

\*\* Angegeben ist die Anzahl der betroffenen Feten sowie in Klammern der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der lebenden Feten.

# Abbildung I

## Metabolismus von Vitamin A





## Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Arbeit, seine Unterstützung und die Freiräume bei der Planung und Durchführung von Projekten. Diese Freiräume erstreckten sich auch auf die Teilnahme an Fachkongressen und Weiterbildungsveranstaltungen, die mir von ihm sowohl zeitlich als auch finanziell gewährt wurden.

Herrn PD Dr. Ulrich Engelhardt gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats und der Betreuung als Mentor. Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann bedanke ich mich für die Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Meinen ehemaligen Kollegen am Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie der FU Berlin danke ich dafür, daß sie mir den eineinhalbjährigen Aufenthalt in Berlin sehr angenehm in Erinnerung behalten ließen. Mein besonderer Dank gilt

- Dr. Georg Tzimas und Dr. Jörn Oliver Saß für die ununterbrochene und geduldige Einarbeitung in dieses spannende Gebiet,
- Dr. Husam Arafa für zahlreiche Diskussionen, die nicht nur fachliche Gebiete betrafen,
- Claudia Plum, Werner Wittfoht und Erika Drews für die wertvolle Unterstützung meiner praktischen Arbeiten,
- den bereits genannten Personen sowie Dr. Susanne Belz, Anja Martina Bohlmann, Dr. Katharine Ehlers, Dr. Ursula Ellerbeck, Dr. Ryohei Hishida, Dr. Renate Krätke, Dr. Sabine Plonait, Matthias Radatz und Ralph Rühl für so manchen geselligen Abend.

Den Kollegen und Mitarbeitern der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover möchte ich ebenfalls für die angenehme und reibungslose Zusammenarbeit danken. Besonders erwähnen möchte ich

- Silke Meyer, die als „nebenberufliche“ Doktorandin wirklich hervorragende Arbeit geleistet und mich bei den *in vitro*- und *in vivo*-Studien am Schwein sehr unterstützt hat,
- Dr. Gerd Hamscher und Carsten Schmidt, die in Bezug auf analytische Probleme immer kompetente Ansprechpartner waren,
- Anja Martina Bohlmann, Dr. Ursula Ellerbeck und Matthias Radatz, mit denen der Umzug von Berlin nach Hannover und der Aufbau des neuen Standortes sehr viel Spaß gemacht hat sowie
- Prof. Dr. M.M.A. Elmazar für die lehrreiche Zusammenarbeit und die nie endende Diskussionsbereitschaft während seine Gastaufenthalte in unserer Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. H.J. Rothkötter danke ich sehr für die freundschaftliche und offene Zusammenarbeit im Rahmen des *in vivo*-Versuches am Schwein

Meiner Freundin Alex danke ich sehr dafür, daß sie die Strapazen und Mühen, die mit den in so kurzer Zeit stattfindenden Umzügen von Hildesheim nach Berlin und anschließend nach Hannover verbunden waren, hat über sich ergehen lassen und mich bei meiner Arbeit immer unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe und ihr Verständnis wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre fortwährende finanzielle Unterstützung überhaupt erst ermöglicht haben, diese Arbeit in Berlin zu beginnen und in Hannover abzuschließen.





## **Lebenslauf**

Thomas Arnhold, geboren am 15.12.1967 in Hildesheim

### **Schule**

8/1974 - 5/1978	Grundschule Nordstemmen
7/1978 - 5/1987	Gymnasium Andreanum in Hildesheim
27. Mai 1987	Erlangen der Hochschulreife
1/1988 – 3/1989	Wehrdienst

### **Studium**

4/1989 - 3/1994	Studium der Lebensmittelchemie, TU Braunschweig
17.10.1991	Vorprüfung für Lebensmittelchemiker
12/1993 - 3/1994	Wissenschaftliche Abschlußarbeit "Bestimmung von Kohlenhydraten in Lebensmitteln mittels HPTLC-AMD"
22.06.1994	Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
4/1994 - 3/1995	Praktische Ausbildung zum Staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Staatlichen Lebensmittel- untersuchungsamt Braunschweig
4. Mai 1995	Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker Ernennung zum Staatlich geprüften Lebensmittel- chemiker

### **Promotion**

8/1995 - 1/1997	<i>Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie</i> Freie Universität Berlin
1/1997 - 8/1999	<i>Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie</i> Tierärztliche Hochschule Hannover

### **Berufstätigkeit**

Seit 9/1999	Laborleiter Abteilung Pharmakokinetik und Metabolismus Boehringer Ingelheim Pharma KG, Biberach
-------------	---

## **Berufliche Fortbildung**

Teilnahme an der Weiterbildung "Fachtoxikologe DGPT" der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

6/1999	<i>Organtoxikologie II</i> Klinikum Erfurt GmbH
3/1999	<i>Immuntoxikologie/Fremdstoffallergie</i> Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, FU Berlin
9/1998	<i>Fremdstoffmetabolismus / Toxikokinetik</i> Institut für Toxikologie, Universität Mainz
3/1998	<i>Molekulare Zelltoxikologie</i> Institut für Toxikologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg
4/1997	<i>Regulatorische Toxikologie</i> Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg
10/1996	<i>Klinische Toxikologie</i> Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover
3/1996	<i>Ökotoxikologie</i> Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden
2/1996	<i>Reproduktionstoxikologie</i> Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie, Freie Universität Berlin

## Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen

10/1998	Wintertagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Hannover
6/1998	FASEB Summer Research Conference on Retinoids, Snowmass Village (CO, USA)
9/1996	Lebensmittelchemikertag, Freiburg i. B.
6/1996	FASEB Summer Research Conference on Retinoids, Copper Mountain (CO, USA)